



**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS A  
PARTIR DE PROTOPLASTOS AISLADOS DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS  
ORGANIZADAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

**JUAN PABLO ARCINIEGAS VEGA**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
VILLAVICENCIO, COLOMBIA  
2019**

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS A  
PARTIR DE PROTOPLASTOS AISLADOS DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS  
ORGANIZADAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

JUAN PABLO ARCINIEGAS VEGA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director: Paul Chavarriaga Aguirre

Biólogo M.A., M.Sc., Ph.D.

Codirector: Jorge Pachón García

Biólogo, M.Sc.

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**VILLAVICENCIO, COLOMBIA**

**2019**


## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor Paul Chavarriaga y a todo el equipo de trabajo de la Plataforma de mejoramiento avanzado del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por la guía y apoyo brindados en la realización del proyecto.

A Alejandro Brand por todas sus enseñanzas sin las cuales la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A los profesores del programa de Biología de la Universidad de los Llanos por contribuir a mi formación profesional a lo largo de estos años.



	<b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>CÓDIGO: FO-DOC-97</b>	
		<b>VERSIÓN: 02</b>	<b>PÁGINA: 5 de 70</b>
	<b>PROCESO DOCENCIA</b>	<b>FECHA: 02/09/2016</b>	
	<b>FORMATO AUTORIZACION DE DERECHOS</b>	<b>VIGENCIA: 2016</b>	

## UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS. FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS

### AUTORIZACIÓN

Yo, Juan Pablo Arciniegas Vega, mayor de edad, vecino de Santiago de Cali, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 1121914279 de Villavicencio, actuando en nombre propio en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE PROTOPLASTOS AISLADOS DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS ORGANIZADAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz), hago entrega del ejemplar y de sus anexos de ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a la **UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, con la finalidad de que se utilice y use en todas sus formas, realice la reproducción, comunicación pública, edición y distribución, en formato impreso y digital, o formato conocido o por conocer de manera total y parcial de mi trabajo de grado o tesis.

Como autor, manifiesto que el trabajo de grado o tesis objeto de la presente autorización, es original y se realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros; por tanto, la obra es de mi exclusiva autoría y poseo la titularidad sobre la misma; en caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, como autor, asumiré toda la responsabilidad, y saldré en defensa de los derechos aquí autorizados, para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia, se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor en Villavicencio - Meta, a los 30 días del mes de septiembre de dos mil diecinueve (2019).

Firma

---

Nombre: Juan Pablo Arciniegas Vega

C.C. No. 1121914279 de Villavicencio

## **CAPÍTULO 1. Informe final.**

### **TABLA DE CONTENIDO**

1. RESUMEN .....	8
2. LISTA DE FIGURAS .....	9
3. LISTA DE TABLAS.....	10
4. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	11
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
6. OBJETIVOS .....	14
6.1. Objetivo general.....	14
6.2. Objetivos específicos .....	14
7. JUSTIFICACIÓN .....	15
8. MARCO DE REFERENCIA, TEÓRICO O CONCEPTUAL .....	16
8.1. Estructuras embriogénicas organizadas (OES) y callo embriogénico friable (CEF) .....	16
8.2. Protoplastos .....	17
9. METODOLOGÍA.....	21
9.1. Propagación de plantas .....	21
9.2. Inducción de estructuras embriogénicas organizadas (OES) .....	21
9.3. Producción y cultivo de protoplastos.....	21
9.3.1. Aislamiento y friabilización de estructuras embriogénicas organizadas (OES): .....	21
9.3.2. Digestión enzimática de tejidos embriogénicos: .....	21
9.3.3. Aislamiento de protoplastos:.....	21
9.3.4. Viabilidad: .....	22
9.3.5. Sistema de cultivo:.....	22
9.3.6. Desarrollo de microcolonias:.....	23
9.3.7. Maduración de microcallos: .....	23
9.4. Análisis estadístico .....	23
10. RESULTADOS.....	24
10.1. Aislamiento de protoplastos .....	24
10.2. Cultivos en medio líquido .....	24
10.3. Cultivos en gotas de agarosa.....	25

10.4. Desarrollo de microcallos.....	28
11. DISCUSIÓN .....	30
12. CONCLUSIONES.....	33
13. REFERENCIAS.....	34
14. ANEXOS .....	43

## 1. RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se caracteriza por ser una raíz con un alto contenido de almidón que tiene usos alimenticios e industriales. Debido a esto, es una especie de interés para mejoramiento genético mediante técnicas biotecnológicas como la edición de genomas. Estas técnicas son necesarias ya que la manipulación genética en yuca presenta barreras por ser una planta altamente heterocigota, lo que hace difícil la segregación de transgenes sin que se pierdan características de genotipos establecidos comercialmente en el proceso. Es por esto que es crucial el desarrollo de métodos de edición libres de ADN. Para este fin, se propuso desarrollar un protocolo de regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas. Los aislamientos tuvieron un rendimiento de  $6,47 \times 10^6$  células/gramo de pesos fresco y una viabilidad del 89,5%. Se probaron dos sistemas de cultivo, pero se optó por las gotas de agarosa por generar estructuras con una forma tridimensional definida. Se comparó el efecto del genotipo, densidad hormonal y densidad celular inicial y se evaluó el número de microcolonias producidos. Los genotipos no mostraron diferencias significativas, contrario a la combinación hormonal y la densidad celular inicial. La combinación de factores con mejores rendimientos fue  $2 \times 10^5$  células/ml en medio con 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de NAA y 1 mg/L BAP. Adicional a esto, en esta combinación de factores se evidenció formación y crecimiento de microcallos del genotipo TMS 60444 de forma esporádica. Para mejorar la frecuencia de formación de microcallos y la subsecuente embriogénesis somática se sugiere hacer cultivos con protoplastos embebidos en agarosa con medio suplementado con 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de NAA y 1 mg/L BAP, utilizar una densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml o superior y agregar otros factores como células nodrizas o proteína LEC2.

**Palabras clave:** *Manihot esculenta*, protoplastos, estructuras embriogénicas organizadas, gotas de agarosa



## 2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de viabilidad de protoplastos con FDA. (A) Protoplastos en luz blanca con aumento de 10X. (B) Protoplastos en fluorescencia con aumento de 10X..... 24

Figura 2. Protoplastos de TMS 60444 en cultivo líquido (A) Protoplastos a los 15 días de cultivo. (B) Microcallos con 2 meses de crecimiento. .... 25

Figura 3. Regeneración de protoplastos de yuca. (A) Estructuras embriogénicas organizadas a partir de las cuales se aislaron protoplastos. (B) Protoplastos recién aislados observados a 40X. (C) Gota de agarosa con densidad inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml en medio con kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L. (D) Gota de agarosa con densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio con NAA 0,5 mg/L y ribósido de zeatina 1 mg/L..... 26

Figura 4. Microcallos formados de protoplastos de TMS 60444 en agarosa en medio con kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L. (A) Microcallo formado en gota de agarosa con densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml a los 2 meses de cultivo. (B) Microcallo formado tubo Falcon con agarosa con densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml a los 2 meses de cultivo. (C) Microcallo en medio ME007 Agar a los 2 meses de cultivo. .... 29

### 3. LISTA DE TABLAS

*Tabla 1.* Número promedio de microcolonias formadas por protoplastos por gota de agarosa. Los tratamientos están definidos como la combinación de las variables combinación hormonal (NZ o KNB), genotipo (60444 o KU50) y densidad celular inicial (1 o  $2 \times 10^5$  células/ml)..... 26

*Tabla 2.* Efecto del genotipo, combinación hormonal y densidad celular inicial en la producción de microcolonias. Diferentes letras en las medias corresponden a diferencias significativas según el test de diferencia mínima significativa (LSD) con un  $P < 0,05$ ..... 27

*Tabla 3.* Efecto conjunto de la combinación hormonal y la densidad celular inicial en la producción de microcolonias. Diferentes letras en las medias corresponden a diferencias significativas según el test de diferencia mínima significativa (LSD) con un  $P < 0,05$ ..... 28

#### **4. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

CEF: Callo embriogénico friable.

FDA: Diacetato de fluoresceína.

GA<sub>3</sub>: Ácido giberélico.

GBSS: Granule-bound starch synthase.

LEC2: Leafy Cotyledon 2.

NAA: Ácido naftalenacético.

OES: Estructuras embriogénicas organizadas.

PEG: Polietilenglicol.

RNP: Ribonucleoproteína.

sgRNA: ARN guía.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La yuca es un cultivo cuya característica principal es poseer una raíz con un alto contenido de almidón útil como fuente de alimentos y en la industria de textiles, papel, materia prima de biocombustibles, entre otros (FAO, 2013). Su producción mundial en los últimos tres años ha alcanzado valores entre los 277 y 278,8 millones de toneladas de raíz, con África, Asia y América Latina como los mayores productores en su orden respectivo (FAO, 2017). Sin embargo, hay factores que comprometen los rendimientos de esta especie, como la susceptibilidad a artrópodos plaga (Bellotti *et al.*, 1994) y patógenos (FAO, 2010). Dada su importancia, es crucial el desarrollo de nuevas tecnologías que aceleren el desarrollo de nuevas variedades con características deseables que le permitan a la yuca enfrentar los desafíos de una población creciente, que demanda más consumo de almidón, en un medio ambiente en constante cambio.

Para cumplir con tal meta, las técnicas de modificación genética se perfilan como un camino prometedor, pues puede generar cambios a nivel genético de forma más rápida y precisa que aquellos obtenidos por mejoramiento convencional (Manshardt, 2004). Para el caso de la yuca, se han realizado trabajos en mejoramiento genético con aplicación de biotecnología relativos a biofortificación (Welsch *et al.*, 2010; Ihemere *et al.*, 2012; Telengech *et al.*, 2015) modificaciones en la composición del almidón con fines industriales, (Zhao *et al.*, 2011) resistencia a patógenos (Ntui *et al.*, 2015; Ojola *et al.*, 2018; Díaz-Tatis *et al.*, 2018), entre otros. Los trabajos anteriores fueron realizados mediante la transformación genética a través de *Agrobacterium tumefaciens*, una metodología con protocolo estandarizado para yuca (Bull *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012). Sin embargo, a la fecha, ninguna de las iniciativas para el mejoramiento de yuca que ha utilizado transgénesis ha producido una variedad que llegue al mercado, posiblemente debido a los altos costos inherentes a la regulación para la liberación de transgénicos en el mundo. Con la revolución de la edición de genomas gracias a los sistemas CRISPR/Cas9 (Khatodia *et al.*, 2016) surgen nuevas oportunidades y enfoques de investigación. A pesar de que el sistema CRISPR/Cas9 puede ser introducido a las plantas a través de *Agrobacterium tumefaciens*, recientemente probado en yuca (Bull *et al.*, 2018), un método libre de transgénesis basado en protoplastos y ribonucleoproteínas,

moléculas híbridas de ácido ribonucleico y proteína (RNPs), sería preferible debido las exigencias y costos de la regulación actual para transgénicos. Además de que su regulación es exhaustiva, el eliminar transgenes a través de segregación sexual en yuca es desventajoso porque altera los genotipos obtenidos mediante edición debido a que la recombinación genética en esta especie altamente heterocigota (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 2016).

Una alternativa al uso de *Agrobacterium tumefaciens* es la regeneración de plantas a partir de protoplastos. Uno de los pilares en la manipulación genética de la yuca es la producción de estructuras conocidas como callos embriogénicos friables (CEF), que se producen a partir de estructuras embriogénicas organizadas (OES por su sigla en inglés) (Taylor *et al.*, 1996). El primero es usado de forma estándar en los procesos de transformación genética (Bull *et al.*, 2009) e inclusive en la producción de protoplastos de yuca (Sofiari *et al.*, 1998; Bull *et al.*, 2018). No obstante, su producción es limitada dado que solo se ha logrado eficientemente en la variedad TMS 60444 (Bull *et al.*, 2009) y la variedad africana TME14 (Nyaboga *et al.*, 2015), mientras que resulta limitado en otros genotipos (Rossin y Rey, 2011; Ochoa *et al.*, 2012; Chetty *et al.*, 2013; Nyaboga *et al.*, 2013).

Una buena cantidad de variedades logran sin embargo producir con cierta eficiencia las OES, requeridas para producir CEF, lo que abre la posibilidad de utilizarlas para aislar protoplastos y regenerar plantas de una cantidad mayor de genotipos, inclusive con importancia económica, posiblemente facilitando la implementación de la edición genética, sin utilizar la transgénesis como intermediaria. Por lo tanto, es necesario definir las condiciones *in vitro* que sean apropiadas para la regeneración de plantas de yuca a partir de protoplastos obtenidos de OES.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Desarrollar un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* a partir de protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

### **6.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la eficiencia de regeneración de plantas *in vitro* a partir de protoplastos de al menos dos variedades/genotipos de yuca.
- Determinar el efecto del estado de dos medios de cultivo (líquido y semisólido) sobre la regeneración de protoplastos de yuca.
- Determinar el impacto de la densidad celular inicial en sobre la regeneración de protoplastos de yuca.
- Comparar el impacto de dos combinaciones hormonales en la regeneración de protoplastos de yuca.

## 7. JUSTIFICACIÓN

Desarrollar una metodología para regenerar plantas a partir de protoplastos aislados de OES es necesario para superar el cuello de botella que genera el uso de FEC, ya que su producción es altamente genotipo dependiente (Liu *et al.*, 2011). Implementar un proceso que sea reproducible en diferentes variedades de yuca abre la posibilidad de implementar tecnologías como CRISPR/Cas9 de una forma libre de transgenes (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 2016), dado que la regulación exhaustiva sobre las plantas con modificaciones genéticas que involucran la inserción de transgenes limita aspectos como la investigación y su entrada al mercado (The Law Library of Congress, 2014). De este modo, se podrían hacer modificaciones precisas en genotipos de importancia comercial sobre características de interés como resistencia a enfermedades tales como la raya marrón de la yuca (Patil *et al.*, 2015; Gomez *et al.*, 2019) y la bacteriosis vascular de la yuca (Cohn *et al.*, 2014; Cohn *et al.*, 2016) que comprometen los rendimientos de este cultivo con pérdidas hasta de 1 billón de dólares al año. O también, edición sobre genes relacionados con la producción de amilosa para generar variedades con almidón ceroso (Waxy). El almidón normalmente tiene un 20-30% de amilosa y un 70-80% de amilopectina, pero las variedades waxy poseen una versión mutada del gen *GBSSI*, el cuál es responsable de la síntesis de amilosa, de modo que el almidón en estas plantas es libre de amilosa (Jobling, 2004). Esta modificación estructural hace que la viscosidad, temperatura de gelatinización, resistencia a la retrogradación y claridad del almidón de variedades waxy sea mayor que la de sus versiones silvestres (Pizarro *et al.*, 2016). Gracias a estas propiedades, este almidón es aplicado en la industria alimenticia para mejorar la suavidad y cremosidad de alimentos enlatados y productos lácteos, ser adecuado como agente espesante para pasteles y alargar la vida útil de alimentos congelados y refrigerados dada su estabilidad al congelarse y descongelarse (Zhao *et al.*, 2011).

## 8. MARCO DE REFERENCIA, TEÓRICO O CONCEPTUAL

### 8.1. Estructuras embriogénicas organizadas (OES) y callo embriogénico friable (CEF)

Uno de los pilares de la ingeniería genética en yuca fue el trabajo de Taylor *et al.* (1996) sobre desarrollo de callos embriogénicos friables, en el que pudo regenerar plantas del genotipo TMS 60444 después de un proceso de embriogénesis somática. Posteriormente, esta variedad se usó como modelo en trabajos de cultivo *in vitro* y transformación genética, a tal punto que se estandarizaron protocolos para modificarla genéticamente con bombardeo de micropartículas (Schöpke *et al.*, 2006) y con *Agrobacterium tumefaciens* (Bull *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012). Con base en este método, ha sido posible transformar y regenerar plantas de este genotipo en varias ocasiones, como en el caso de Zhao *et al.* (2011), quienes transformaron plantas para producir almidón ceroso o waxy, regenerando plantas; o Ihemere *et al.* (2012), quienes introdujeron el gen *FEA1* para mayor asimilación de hierro en la raíz y analizaron los contenidos de hierro y zinc en raíces de plantas de hasta un año de edad; y Vanderschuren *et al.* (2012), quienes produjeron plantas resistentes a la enfermedad de la raya marrón con un éxito de enraizamiento del 90%.

Sin embargo, la regeneración *in vitro* de la yuca es altamente genotipo-dependiente (Liu *et al.*, 2011). Se han hecho varios esfuerzos por adaptar los protocolos para producción de CEF en TMS 60444 a otras variedades por el interés que ha existido de modificarlas genéticamente, pero el éxito ha sido moderado. Zainuddin *et al.* (2012) trataron de adaptar los procedimientos de TMS 60444 a las variedades TME3, TME7 y TME14, con inducción de CEF entre 10% y 20%. Ochoa *et al.* (2012) evaluaron la embriogénesis somática y producción de callo embriogénico en las variedades SG107-35 y BRA685, de las cuales solo la segunda produjo CEF, pero aun así no proliferó. Nyaboga *et al.* (2013) obtuvieron exitosamente OES a partir de brotes axilares con una frecuencia de 65% a 86% de ocho genotipos de yuca (TMS 60444, Ebwanatereka, Serere, Kidandameno, Mkombozi, Kibaha, Albert, TME14), pero el CEF solo se produjo en la mitad de ellos. Apio *et al.* (2015) trabajaron con los genotipos Bukalasa, Aladu y Ebwanateraka, con los



cuales obtuvieron OES con frecuencias entre el 76% y 85%, obteniendo CEF y plantas regeneradas solo en dos de los genotipos evaluados. Dhanya *et al.* (2017) usaron los cultivares H226, H165, Sree Vijaya y Sree Sahya para embriogénesis somática, con los que lograron producir OES; no obstante, la producción de CEF se restringió a H226 y H165 con desarrollo del 20% y 42%, respectivamente. Lentz *et al.* (2018) utilizaron tres variedades de Brasil (Verdinha, Amansa burro y Tapioqueria) para el proceso de inducción de CEF, y aunque lograron producir embriones somáticos de buena calidad en las tres, solo fue posible obtener CEF de Verdinha al acortar el periodo de multiplicación de embriones torpedo y aumentar la cantidad de picloram en la fase de multiplicación de CEF respecto al método de Bull *et al.* (2009).

## **8.2. Protoplastos**

La generación de protoplastos en yuca se remonta al trabajo de Shahin y Shepard (1980), quienes adaptaron un protocolo diseñado para papa que se basaba en el uso de células de mesófilo del cultivar Mexico N° 35 y consiguieron rendimientos de  $5,6 \times 10^6$  células por gramo de hoja fresca, y obtuvieron callos que generaron brotes de forma esporádica. Anthony *et al.* (1995) aislaron protoplastos de hojas de la variedad M Thai 8 con rendimientos de  $1,95 \times 10^7$  células por gramo de hoja fresca usada, pero obtuvieron solo callos friables con 1 o 2 raíces, sin lograr brotes. No fue sino hasta el estudio de Sofiari *et al.* (1998) en el que se usaron células embriogénicas obtenidas de CEF de TMS 60444 para aislar protoplastos, de los cuales obtuvieron hasta  $14,5 \times 10^5$  células por gramo de peso fresco, y con estas produjeron 45 plantas a partir de 15 líneas independientes, de las que sobrevivieron 43 en invernadero. Wen *et al.* (2012) nuevamente usaron CEF de TMS 60444 para producir protoplastos y consiguieron rendimientos de  $3,5 \times 10^6$  protoplastos por gramo de tejido fresco usado, 1479 callos compactos que se desarrollaron en 757 embriones cotiledonares y 186 plantas regeneradas. Recientemente, Fitriani *et al.* (2019) incursionaron en la regeneración de protoplastos de yuca obtenidos de mesófilo en tres variedades (Metenga 2, Ubi Kining y Gajah), pero solo llegaron a la formación de microcallos y callos.

El uso de protoplastos de yuca ha tenido aplicaciones diferentes a la regeneración de plantas. Wu *et al.* (2017) desarrollaron un sistema de expresión transitoria en

protoplastos de mesófilo de la variedad South China 8 (SC8). Bull *et al.* (2018) editaron el gen *GBSSI* de yuca y para probar la efectividad de los ARNs guía diseñados, ellos introdujeron ribonucleoproteínas en protoplastos aislados de hojas de yuca, sin regenerar plantas a partir de ellos. Hasta la fecha, los trabajos en los que se reporta regeneración de plantas a partir de protoplastos, son aquellos en los que se ha utilizado tejido embriogénico tipo CEF, únicamente de la variedad TMS 60444.

Respecto a los trabajos relacionados con regeneración de plantas a partir de protoplastos, los factores que se modifican incluyen genotipo o variedad, tejido del cual se aíslan los protoplastos, tipo de solución enzimática, densidad celular inicial, composición y consistencia del medio de cultivo (Deryckere *et al.*, 2012; Eeckhaut *et al.*, 2013; Kielkowska y Adamus, 2014; Máckowska *et al.*, 2014; Tomiczak *et al.*, 2015). Dependiendo del medio de cultivo, los protoplastos pueden estar en un ambiente líquido o contener un agente gelificante que los atrapa en una matriz sólida (Eeckhaut *et al.*, 2013). Los agentes gelificantes reportados en estos estudios son variados, incluyen gelrite, agarosa y alginato (Shiba y Mii, 2005, Jones *et al.*, 2014 Kielkowska y Adamus, 2014, Máckowska *et al.*, 2014, Lopez-Arellano *et al.*, 2015). Dentro de los métodos en los que los protoplastos son embebidos en una fase sólida están las gotas de agarosa y rodearlas de una fase líquida que les provee de nutrientes, vitaminas y factores de crecimiento vegetal (Deryckere *et al.*, 2012).

El cultivo de protoplastos en gotas de agarosa es un método que ha sido probado en diferentes géneros de plantas. Conde y Santos (2006) aplicaron este sistema en *Ulmus minor* Mill. (Ulmaceae), y lograron obtener callos con características embriogénicas. Jones *et al.* (2014) probaron el cultivo en líquido de gotas de alginato y gotas de agarosa, pero los protoplastos solo sobrevivieron en este último. Junto con factores como la adición de TDZ en la fase de inducción de brotes y GA<sub>3</sub> en la proliferación de brotes, se regeneraron plantas de los protoplastos que fueron ambientadas en invernadero.

Otro género estudiado ha sido *Gentiana*. Fuik y Rybczynki (2007) probaron cultivos en líquido, capas delgadas de agarosa y gotas de agarosa con protoplastos de *Gentiana kurro* (Royle). En este caso, el uso de gotas de agarosa con modificación en la fuente de nitrógeno y reguladores de crecimiento permitieron el aumento de la división de

protoplastos, lo que se vio reflejado en la producción de un mayor número de microcallos, y finalmente en la obtención de plantas regeneradas. Tomiczak *et al.* (2015) usaron protoplastos de *Gentiana decumbens* L.f. en gotas de agarosa, lo que junto con el uso de TDZ en lugar de BAP resultó en una mayor división celular, proliferación de callo y regeneración de plantas.

También es de resaltar el estudio realizado por Deryckere *et al.* (2012) con diferentes genotipos de especies del género *Cichorium*. En este estudio se comparó el efecto de usar medio líquido, sólido y gotas de agarosa de bajo punto de gelificación. Los mejores resultados se obtuvieron con dichas gotas, con una regeneración de plantas a partir de callo proveniente de protoplastos en los 11 genotipos probados, de modo que se evidenció por primera vez regeneración de plantas a partir protoplastos de *C. envidia* y aumento de esta en otras especies de *Cichorium*.

Una de las aplicaciones más relevantes de la regeneración de plantas a partir de protoplastos es la edición de genomas libre de ADN. La edición de genomas se realiza mediante CRISPR/Cas9, en donde la enzima Cas9 es guiada a un punto específico del genoma por un ARN guía (sgRNA en inglés), realizando un corte de doble cadena en el sitio de interés, que al ser reparado por mecanismos internos de la célula y genera cambios en la secuencia nucleotídica, conocidos comúnmente como INDELS (inserciones y/o deleciones de nucleótidos) (Bortesi y Fisher, 2015). En plantas, una vía para introducir la maquinaria de edición es mediante el uso de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Soda *et al.*, 2017), la cual ha sido utilizada previamente en yuca para edición de genomas (Odipio *et al.*, 2017; Bull *et al.*, 2018; Gomez *et al.*, 2019). Sin embargo, la regulación exhaustiva de los transgénicos, junto a la dificultad de segregar sexualmente transgenes en especies altamente heterocigotas como la yuca (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 2016) hacen necesaria la búsqueda de métodos alternos como la introducción en protoplastos de la maquinaria de edición un complejo compuesto por una proteína Cas9 pre-ensamblada con sgRNA sintetizado *in vitro*, a lo que se denomina ribonucleoproteína (RNP), mediante transfección con polietilenglicol (PEG) (Zhang *et al.*, 2019). Una vez allí, este complejo se encarga de realizar una ruptura de doble cadena de ADN que posteriormente es reparada y da como

resultado una edición en el genoma sin la incorporación de transgenes en las células vegetales en ningún momento (Woo *et al.*, 2015). Sin embargo, la edición libre de ADN depende de un método eficiente de regeneración de plantas a partir de protoplastos. Hoy en día, hay especies en las que se ha logrado introducir RNPs por transfección con PEG y regenerar plantas, tales como *Nicotiana tabacum* (Lin *et al.*, 2018), *Solanum tuberosum* (Andersson *et al.*, 2018), *Lactuca sativa* (Woo *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2019).

## 9. METODOLOGÍA

### 9.1. Propagación de plantas

Se propagaron ápices y nudos de plantas *in vitro* de los genotipos TMS 60444 (como genotipo modelo) y KU50 en medio ME001. Se dejaron crecer por 30 días a 28°C y fotoperiodo 16/8.

### 9.2. Inducción de estructuras embriogénicas organizadas (OES)

Se cortó el ápice y las hojas de las plantas, el ápice fue propagado nuevamente en medio ME001. Estas plantas permanecieron 3 días para que sus yemas axilares crecieran en este lapso. Después, las yemas axilares fueron cortadas y puestas en medio líquido ME006.3 en oscuridad por 22 días para la inducción de embriogénesis somática. Transcurrido este tiempo, se transfirieron a medio ME007, donde permanecieron en oscuridad durante 21 días para la formación de estructuras embriogénicas organizadas (OES).

### 9.3. Producción y cultivo de protoplastos

**9.3.1. Aislamiento y friabilización de estructuras embriogénicas organizadas (OES):** Se tomó una cantidad equivalente a 18 clústeres de callos y se seleccionó solo el tejido embriogénico inmaduro para ser macerado en cada aislamiento.

**9.3.2. Digestión enzimática de tejidos embriogénicos:** Se adicionaron 2 ml de medio TM2G modificado de Sofiari *et al.* (1998) (Anexo 1) y 2 ml de solución enzimática (Anexo 2) y Se digirió el tejido toda la noche a 28°C 30 rpm en oscuridad.

**9.3.3. Aislamiento de protoplastos:** El procedimiento para aislamiento de protoplastos y regeneración de plantas se basó en el método de Sofiari *et al.* (1998) con modificaciones. Al día siguiente del inicio de la digestión enzimática, se filtró la suspensión de digestión a través de tres capas de papel Miracloth. Después, se realizaron dos lavados con solución de lavado WI (Tabla 1) y centrifugación a 1000 rpm por 5 min. Se resuspendió el pellet en 1 ml medio TM2G para continuar con el cultivo o

en solución WI para transfección. Finalmente, se cuantificó la densidad de protoplastos en una cámara Neubauer en microscopio óptico.

**9.3.4. Viabilidad:** Se agregaron 20 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) 0,5% (p/v) a 500 µl de una solución con protoplastos, luego se incubó por 10 min (Larkin, 1976). La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia y el porcentaje de células viables se expresó como la porción de células teñidas respecto a las células totales en el campo óptico.

**9.3.5. Sistema de cultivo:** La suspensión de protoplastos se probó en dos sistemas de cultivo, uno líquido y otro con gotas de agarosa. El medio líquido consistió en 6 ml de medio TM2G suplementado con NAA 0,5 mg/L y ribósido de zeatina 1 mg/L, con una densidad aproximada de protoplastos de  $5 \times 10^5$  células/ml servidos en una caja Petri pequeña (60 x 15 mm).

En el sistema de cultivo de gotas de agarosa se hicieron experimentos preliminares con cuatro versiones diferentes del medio TM2G, que se diferenciaron por su combinación hormonal:

Combinación PZ: picloram 12 mg/L, ribósido de zeatina 1 mg/L.

Combinación DNB: 2,4-D 0,5 mg/L, NAA 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L.

Combinación KNB: kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L.

Combinación NZ: NAA 0,5 mg/L, ribósido de zeatina 1 mg/L.

De estas, se continuaron experimentos con KNB y NZ.

Las gotas de agarosa se hicieron al mezclar partes iguales de medio líquido TM2G 2X con solución de agarosa de bajo punto de gelificación (Sigma) al 1,2%. Luego, la solución con protoplastos fue agregada a 34°C, con la que se sirvieron 10 gotas de 100 µl c/u con una densidad de protoplastos aproximada de  $1 \times 10^5$  o  $2 \times 10^5$  células/ml en cajas Petri profundas (100 x 25 mm), y se agregaron 10 ml de medio líquido a cada caja para suministrar sustancias necesarias para el desarrollo de los protoplastos y prevenir la deshidratación. La agarosa que no fue servida en gotas fue conservada en tubos Falcon

de 50 ml a un volumen aproximado de 5 ml. Todas las versiones del medio TM2G fueron suplementadas con cefotaxime a una concentración final de 150 µg/ml.

**9.3.6. Desarrollo de microcolonias:** La concentración inicial de glucosa en el medio TM2G fue de 0,33 mol/L, pero esta fue paulatinamente reducida con los refrescos de medio. Para las cajas con gotas de agarosa, cada 10 días se refrescaba el cultivo de protoplastos añadiendo medio TM2G con 0,33 mol/L de las primeras dos veces, luego con 0,30 mol/L de glucosa por dos veces más y 0,25 mol/L de glucosa las dos últimas veces.

Para los cultivos en medio líquido, se realizó la misma reducción gradual de la concentración de glucosa. Al terminar este proceso, se reemplazó el medio TM2G con medio SH líquido y el cultivo permaneció 4 semanas a 28°C en oscuridad.

**9.3.7. Maduración de microcallos:** Los microcallos formados en gotas de agarosa fueron transferidos a medio ME007 Agar, mientras que aquellos obtenidos en medio líquido se transfirieron a medio MSN.

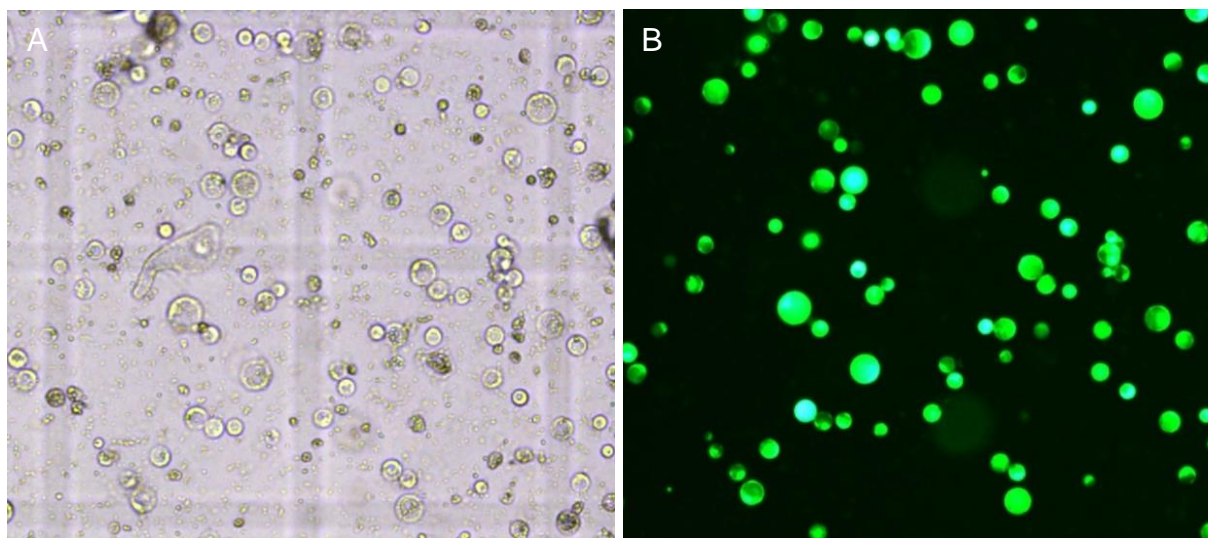
#### **9.4. Análisis estadístico**

El número promedio de microcolonias por gota de agarosa de cada tratamiento (combinación hormonal/genotipo/densidad celular inicial) fue registrado. La medición se hizo con fotos tomadas a la misma altura dado que las gotas tienen una estructura tridimensional, y la cuantificación se hizo con el plugin cell counter de ImageJ. Se realizó un test de diferencia mínima significativa (LSD) con un  $P < 0,05$  para determinar el efecto de cada variable en el número de microcolonias con el software SAS 9.4.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Aislamiento de protoplastos

Los rendimientos de los aislamientos de protoplastos por el medio descrito fueron de  $6,47 \times 10^6$  células/gramo de pesos fresco, con una viabilidad del 89,5% (Figura 1).



*Figura 1.* Prueba de viabilidad de protoplastos con FDA. (A) Protoplastos en luz blanca con aumento de 10X. (B) Protoplastos en fluorescencia con aumento de 10X.

### 10.2. Cultivos en medio líquido

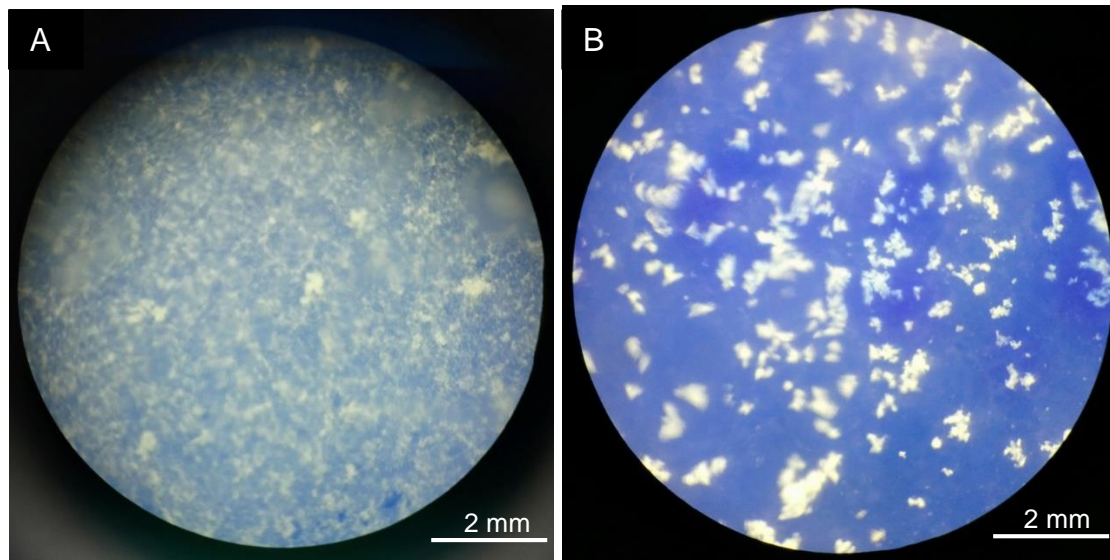
El sistema de cultivo en líquido de protoplastos de yuca provenientes de tejido embriogénico fue implementado por Sofiari *et al.* (1998), quienes partieron de CEF para este proceso. Este método se adaptó para protoplastos provenientes de OES. Sin embargo, esta estrategia presentó las siguientes barreras:

-En el primer mes de cultivo los protoplastos se aglomeraron y precipitaron, por lo que gran parte del material formó una capa en el fondo del recipiente (Figura 2A), por lo tanto, esta porción del material no se convirtió en microcallos.

-En los meses subsiguientes, se formaron numerosos microcallos en los cultivos en líquido. Estas estructuras eran de coloración de blanca a ligeramente amarilla y de consistencia blanda, no adoptaron una forma tridimensional definida (Figura 2B), de



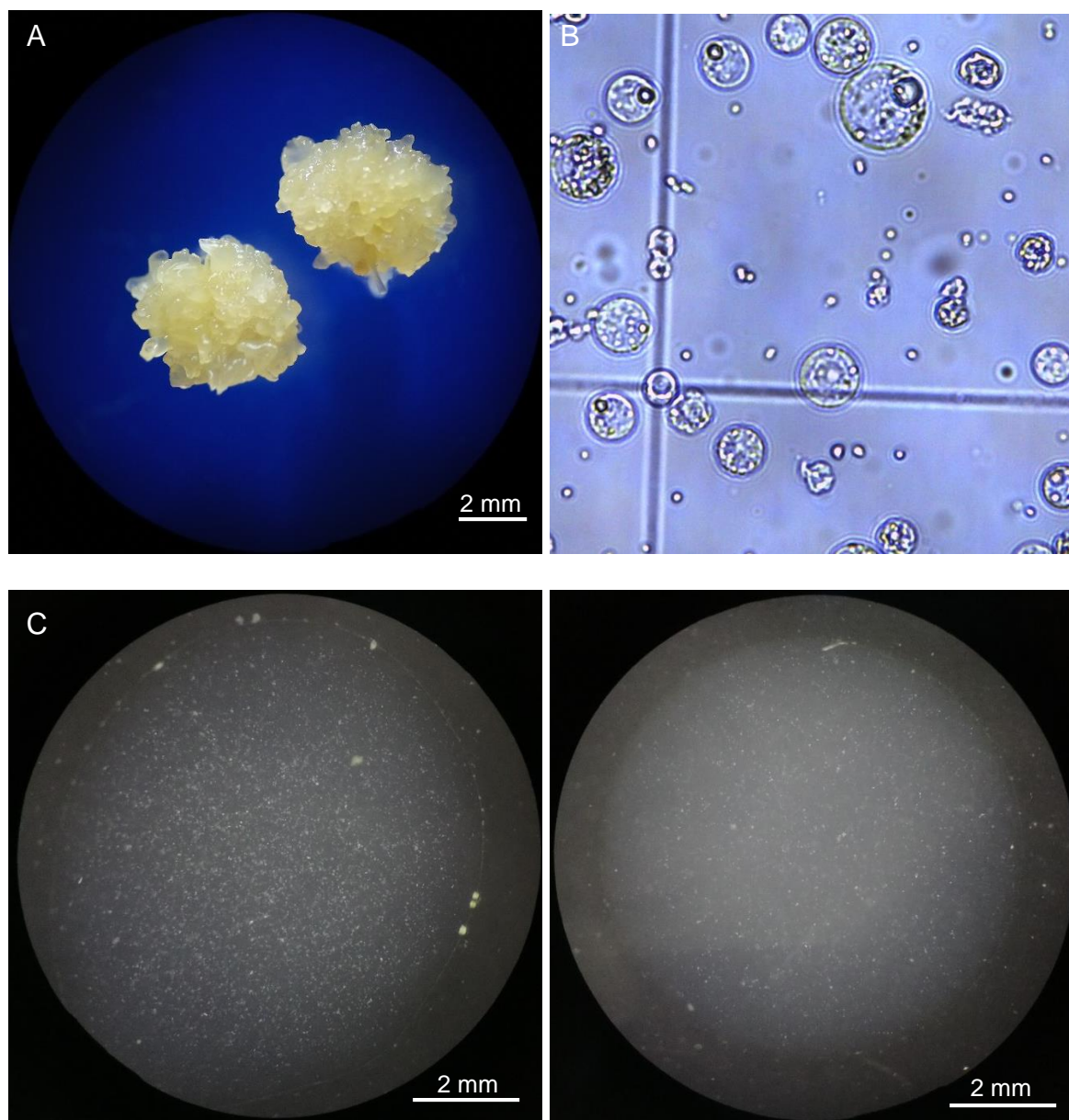
modo que no resistieron el cambio de medio líquido a sólido. Debido a esto, se optó por no continuar con este sistema de cultivo.



*Figura 2.* Protoplastos de TMS 60444 en cultivo líquido (A) Protoplastos a los 15 días de cultivo. (B) Microcalllos con 2 meses de crecimiento.

### **10.3. Cultivos en gotas de agarosa**

Se cuantificó el número de microcolonias formadas por los protoplastos en las gotas de agarosa. El tratamiento con mayor número promedio de microcolonias por gota de agarosa fue KBN/60444/ $2 \times 10^5$  células/ml (Tabla 1). Además, en este tratamiento se observaron estructuras de tipo microcallo en la periferia de las gotas (Figura 3D). Por el contrario, el tratamiento con menor número de microcolonias fue KBN/60444/ $1 \times 10^5$  células/ml (Tabla 1, Figura 3C).



*Figura 3.* Regeneración de protoplastos de yuca. (A) Estructuras embriogénicas organizadas a partir de las cuales se aislaron protoplastos. (B) Protoplastos recién aislados observados a 40X. (C) Gota de agarosa con densidad inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml en medio con kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L. (D) Gota de agarosa con densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio con NAA 0,5 mg/L y ribósido de zeatina 1 mg/L.

*Tabla 1.* Número promedio de microcolonias formadas por protoplastos por gota de agarosa. Los tratamientos están definidos como la combinación de las variables

combinación hormonal (NZ o KNB), genotipo (60444 o KU50) y densidad celular inicial (1 o 2 x 10<sup>5</sup> células/ml).

Tratamiento	Número promedio de microcolonias por gota de agarosa
NZ/60444/1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1302,87 ± 457,55
KNB/60444/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2955,50 ± 343,41
KNB/KU50/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2927,20 ± 308,65
NZ/60444/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2325,30 ± 307,98
KNB/60444/1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1262,10 ± 299,57
NZ/KU50/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2571,80 ± 240,61

Se determinó que el genotipo no tuvo un efecto significativo sobre el número de microcolonias, mientras que la combinación hormonal y la densidad celular inicial sí (Tabla 2). Una densidad de 2 x 10<sup>5</sup> células/ml y la combinación hormonal KNB resultaron en el mayor número promedio de microcolonias por gota de agarosa (Tabla 3).

*Tabla 2.* Efecto del genotipo, combinación hormonal y densidad celular inicial en la producción de microcolonias. Diferentes letras en las medias corresponden a diferencias significativas según el test de diferencia mínima significativa (LSD) con un P<0,05.

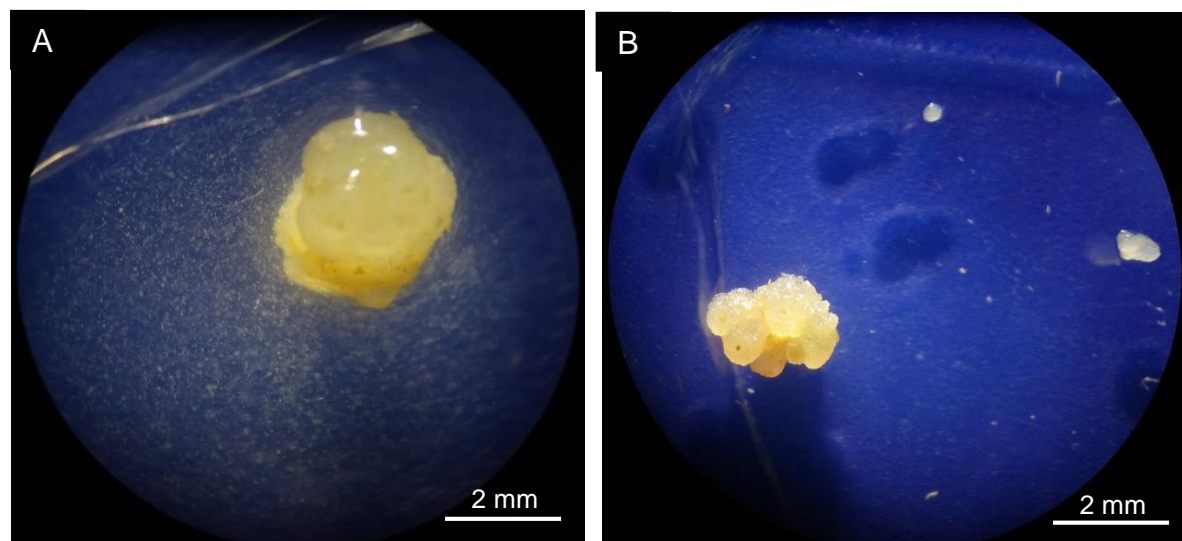
Factor	Número promedio de microcolonias por gota de agarosa
<b>Genotipo</b>	
60444	1833,85 ± 30,18 <sup>A</sup>
KU50	1919,26 ± 54,51 <sup>A</sup>
<b>Combinación hormonal</b>	
KNB	1949,13 ± 42,47 <sup>A</sup>
NZ	1805,74 ± 39,33 <sup>B</sup>
<b>Densidad celular inicial</b>	
1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1311,85 ± 37,56 <sup>A</sup>
2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2682,97 ± 43,90 <sup>B</sup>

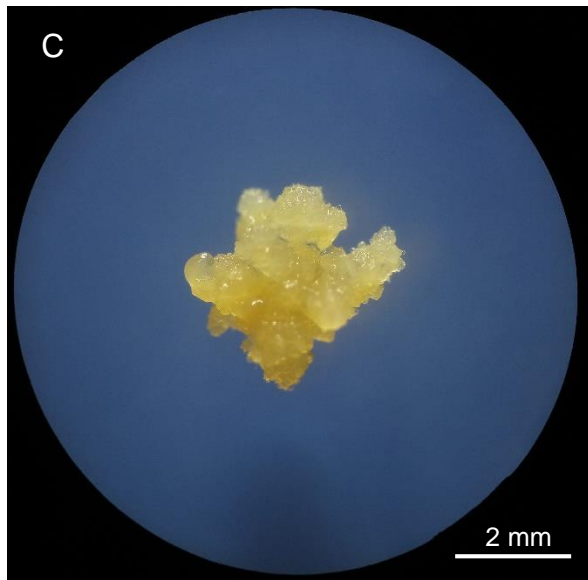
*Tabla 3.* Efecto conjunto de la combinación hormonal y la densidad celular inicial en la producción de microcolonias. Diferentes letras en las medias corresponden a diferencias significativas según el test de diferencia mínima significativa (LSD) con un  $P < 0,05$ .

Factores	Número promedio de microcolonias por gota de agarosa
KNB/ $2 \times 10^5$ células/ml	$2942,42 \pm 68,07^A$
NZ/ $2 \times 10^5$ células/ml	$2446,40 \pm 56,64^B$
KNB/ $1 \times 10^5$ células/ml	$1291,16 \pm 47,42^C$
NZ/ $1 \times 10^5$ células/ml	$1332,86 \pm 49,45^C$

#### 10.4. Desarrollo de microcallos

A pesar de que en los experimentos previamente descritos con gotas de agarosa no se formaron microcallos, en los ensayos preliminares con gotas de agarosa en diferentes combinaciones hormonales fue posible obtenerlos de protoplastos de TMS 60444 de forma esporádica con KNB. Los microcallos aparecieron en las gotas de agarosa y en los tubos Falcon con agarosa (Figura 4 A y B). Estas estructuras se caracterizaron por su consistencia dura y color amarillo. Fueron transferidos a medio ME007 Agar para su desarrollo subsecuente. Hasta la fecha, se obtuvieron callos como el de la Figura 4C, que siguen en el proceso de regeneración.





*Figura 4.* Microcallos formados de protoplastos de TMS 60444 en agarosa en medio con kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L. (A) Microcallo formado en gota de agarosa con densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml a los 2 meses de cultivo. (B) Microcallo formado tubo Falcon con agarosa con densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml a los 2 meses de cultivo. (C) Microcallo en medio ME007 Agar a los 2 meses de cultivo.

## 11. DISCUSIÓN

La densidad celular inicial para los protoplastos de yuca aislados de OES con mejor rendimiento fue de  $2 \times 10^5$  células/ml. En protoplastos de CEF de yuca cultivados en líquidos se probaron densidades de 2, 3, 5 y  $10 \times 10^5$  células/ml, de las cuales  $5 \times 10^5$  células/ml dio los mejores rendimientos (Sofiari *et al.*, 1998). Wen *et al.* (2012) compararon las densidades de 2 y  $5 \times 10^5$  células/ml en cultivos en líquido de protoplastos obtenidos de CEF y determinaron que  $5 \times 10^5$  células/ml favoreció la formación de embriones somáticos. Sin embargo, la densidad inicial óptima suele variar de una especie a otra, hay reportes de regeneración de protoplastos embebidos en matriz sólida a densidades menores  $5 \times 10^5$  células/ml. Deryckere *et al.* (2012) probaron densidades desde 1 hasta  $20 \times 10^4$  células/ml, con las que observaron un aumento progresivo de microcallos hasta  $5 \times 10^4$  células/ml, dado que valores superiores a esta concentración disminuyeron significativamente la eficiencia. Por otro lado, hay reportes de regeneración con densidades iniciales óptimas de  $1 \times 10^5$  células/ml (Duquenne *et al.*, 2007; Bertini *et al.*, 2019; Tomiczak *et al.*, 2015),  $2 \times 10^5$  células/ml (Conde y Santos, 2006; Fiuk y Rybczynski, 2007; Jones *et al.*, 2014),  $3,5 \times 10^5$  células/ml (Shi *et al.*, 2016; Rahmani *et al.*, 2016) y  $4 \times 10^5$  células/ml (Kielkowska y Adamus, 2018). Las células estimulan la división mitótica de células adyacentes al liberar factores de crecimiento al medio, de modo que una densidad celular por debajo de la óptima ocasiona una incapacidad de los protoplastos en mantener división celular (Davey *et al.*, 2005). Esto se observó con la densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml, ya que el número promedio de microcolonias por gotas fue menor. A pesar de que con  $2 \times 10^5$  células/ml se obtuvieron más microcolonias, los reportes de cultivo de protoplastos de yuca manejan densidades mayores, de modo que probar con aumentar el número inicial de células podría promover la división celular y subsecuente formación de microcallos.

Los factores de crecimiento vegetal (FCVs) usados en los medios de cultivo de protoplastos son un componente variable. La combinación hormonal con mayor número de microcolonias en las gotas de agarosa y aparición esporádica de microcallos formados a partir de protoplastos obtenidos de OES de yuca fue 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de NAA. En yuca, el uso de 0,5 mg/L de NAA y 1 mg/L de ribósido

de zeatina en protoplastos de CEF ha sido efectivo para su regeneración (Sofiari *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2012), mientras que en protoplastos de hojas de yuca con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de NAA se indujo formación de microcallos (Fitriani *et al.*, 2019). El mejor rendimiento del tratamiento KNB puede deberse a la presencia de otras citoquininas como BAP, que ha resultado efectivo en otras especies (Jones *et al.*, 2014; Rahmani *et al.*, 2016, Shi *et al.*, 2016, Bertini *et al.*, 2019, Park *et al.*, 2019).

El efecto benéfico de embeber los protoplastos en gotas de agarosa ha sido reportado previamente (Jones *et al.*, 2014; Tomiczak *et al.*, 2015; Bertini *et al.*, 2019). Duquenne *et al.* (2007) reportaron ventajas al cultivar protoplastos de *Spathiphyllum wallisii* y *Anthurium scherzerianum* en gotas de agarosa. Los protoplastos de estas especies se precipitaron al fondo de la caja Petri al estar en medio líquido, como en los experimentos preliminares del presente trabajo. Afirmaron que los protoplastos al encontrarse precipitados tenían menor accesibilidad a gases, además de que las células sanas estarían expuestas a mayores concentraciones de toxinas provenientes de células muertas vecinas. En un estudio con protoplastos de *Cichorium* (Deryckere *et al.*, 2012) se logró regeneración en la mayoría de genotipos y géneros probados al implementar el sistema de gotas de agarosa, lo cual no pudieron obtener con medio líquido solamente. Las ventajas observadas al usar gotas de agarosa fueron: distribución uniforme de las células en la agarosa, lo que evita aglomeración común en medio líquido; intercambio de nutrientes y gases con la fase líquida que los rodea con bajas concentraciones de agarosa, por el orden de 0,6%. López-Arellano *et al.* (2015) determinaron que una de las ventajas de las gotas de agarosa sobre el cultivo líquido en la regeneración de protoplastos de *Stevia rebaudiana* es que esta fase sólida estimula la división de estas células en las primeras etapas del cultivo.

Los reportes de regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de hojas incluyen varias especies tales como *Lactuca sativa* (Park *et al.*, 2019), *Solanum tuberosum* (Andersson *et al.*, 2018), *Vitis vinífera* (Bertini *et al.*, 2019), *Brassica oleraceae* (Kielkowska *et al.*, 2018), *Gentiana decumbens* (Tomiczak *et al.*, 2015), *Stevia rebaudiana* (López-Arellano *et al.*, 2015), entre otras. Las hojas son explantes que suelen estar disponibles dado que solo requiere de un apropiado protocolo para mantener



plantas *in vitro* de una determinada especie y permite la obtención de protoplastos inclusive de varios genotipos. En el caso de *M. esculenta*, investigadores han aislado protoplastos de hojas de los genotipos Gajah, Ubi Kuning y Metenga 2 para regeneración de plantas y llegaron a la formación de microcallos (Fitriani *et al.*, 2019). A pesar de que las hojas permiten el aislamiento de protoplastos de varios genotipos, los sistemas de regeneración de plantas a partir de protoplastos suelen involucrar embriogénesis somática (Sofiari *et al.*, 1998, Tomiczak *et al.*, 2005; Máckowska *et al.*, 2013, López-Arellano), de modo que el tejido embriogénico puede resultar más adecuado ya los niveles de expresión de genes relacionados con embriogénesis son superiores a los de hojas (Brand *et al.*, 2019).

Para mejorar la eficiencia de los procesos de formación de callo embriogénico y embriogénesis somática en los sistemas de regeneración de plantas a partir de protoplastos de yuca se puede incursionar en la implementación de células nodrizas y en la introducción de la proteína LEC2 en protoplastos. Las células nodrizas consisten en capas de células embriogénicas que se incorporan en el cultivo de protoplastos y liberan moléculas que estimulan procesos de división celular, lo que puede mejorar la formación de callo embriogénico en estos cultivos, así como ha sucedido en otras especies (Sushamakumari *et al.* 2000; Assani *et al.*, 2006; Chabane *et al.*, 2007). En cuanto a la proteína LEC2, estudios previos demostraron que su sobreexpresión promueve embriogénesis somática en yuca (Brand *et al.*, 2019) y *Theobroma cacao* (Fister *et al.*, 2018), de modo que incorporarla en los protoplastos podría mejorar el proceso de regeneración.



## 12. CONCLUSIONES

Se cultivaron protoplastos aislados de estructuras embriogénicas de dos genotipos de yuca en dos sistemas diferentes, uno líquido y otro de gotas de agarosa. El cultivo en líquido presentó desventajas como precipitación del material y formación de tejido blando y sin estructura tridimensional clara, de modo que se optó por las gotas de agarosa. Posteriormente, se evaluó el efecto del genotipo, combinación hormonal y densidad celular inicial en el desarrollo de los protoplastos en gotas de agarosa. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de microcolonias formadas por protoplastos de TMS60444 y KU50, lo que es un indicador de que el método de regeneración puede ser aplicado a más de un genotipo sin aplicarle variaciones marcadas. En cuanto a la densidad celular inicial y la combinación hormonal, el tratamiento con mejor rendimiento fue  $2 \times 10^5$  células/ml y 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de NAA y 1 mg/L de BAP. Dado que solo se logró obtener microcallos de forma esporádica, es necesario optimizar las condiciones del sistema de cultivo de protoplastos para aumentar la frecuencia de formación de callos, y subsecuentemente procesos de embriogénesis somática y regeneración. Para ello, se sugiere continuar con las gotas de agarosa dado el efecto positivo que tiene el embeber los protoplastos en una fase sólida, utilizar el medio TM2G con la combinación hormonal KNB, usar una densidad inicial celular igual o superior a  $2 \times 10^5$  células/ml, e incorporar nuevos factores como células nodrizas o la proteína LEC2.

### 13. REFERENCIAS

- Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält AS, Ohlsson P, Gonzales MN, Samuelsson M, Hofvander P. 2018. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*, 164: 378-384.
- Anthony P, Davey MR, Power JB, Lowe KC. 1995. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplast. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 42: 299-302.
- Apio HB, Alicai T, Baguma Y, Mukasa SB, Bua A, Taylor N. 2015. Production of friable embryogenic callus and regeneration of Ugandan farmer-preferred cassava genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 14(22): 1854-1864.
- Assani A, Chabane D, Foroughi-Wehr B, Wenzel G. 2006. An improved protocol for microcallus production and whole plant regeneration from recalcitrant banana protoplasts (*Musa spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 257-264.
- Bellotti BC, Braun AR, Arias B, Castillo JA, Guerrero JM. 1994. Origin and management of neotropical cassava arthropod pests. *African Crop Science Journal*, 2(4): 407-417.
- Bertini E, Tornielli GB, Pezzotti M, Zenoni S. 2019. Regeneration of plants from embryogenic callus-derived protoplasts of Garganega and Sangiovese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-8.
- Bortesi L, Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33: 41-52.
- Brand A, Quimbaya M, Tohme J, Chavarriaga-Aguirre P. 2019. Arabidopsis LEC1 and LEC2 Orthologous Genes Are Key Regulators of Somatic Embryogenesis in Cassava. *Front Plant Sci*, 10: 673.
- Bull SE, Owiti JA, Niklaus M, Beeching JR, Gruissem W, Vanderschuren H. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nature Protocols*, 4(12): 1845-1854.

- Bull SE, Seung D, Chanez C, Mehta D, Juon JE, Truernit E, Hockmuth A, Zurkirchen I, Zeeman SC, Gruissem W, Vanderschuren H. 2018. Accelerated ex situ breeding of *GBSS*- and *PTST1*-edited cassava for modified starch. *Science Advances*, 4(9): eaat6086.
- Chabane D, Assani A, Bouguedoura N, Haïcour R, Ducreux G. 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *C. R. Biologies*, 330: 392-401.
- Chavarriaga-Aguirre P, Brand A, Medina A, Prías M, Escobar R, Martinez J, Díaz P, López C, Roca WM, Tohme J. 2016. The potential of using biotechnology to improve cassava: a review. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 52: 461-478.
- Chetty CC, Rossin CB, Gruissem W, Vanderschuren H, Rey MEC. 2013. Empowering biotechnology in southern Africa: establishment of a robust transformation platform for the production of transgenic industry-preferred cassava. *New Biotechnology*. 30(2): 136-143.
- Cohn M, Bart RS, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou BH, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2014. *Xanthomonas axonopodis* Virulence Is Promoted by a Transcription Activator-Like-Effector-Mediated Induction of a SWEET Sugar Transporter in Cassava. *MPMI*, 27: 1186-1198.
- Cohn M, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2016. Comparasion of gene activation by two TAL effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* reveals candidate host susceptibility genes in cassava. *Molecular plant pahtology*, 17(6): 875-889.
- Conde P, Santos Conceicao. 2006. An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill. protoplast isolation and culture in agarose droplets. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 359-366.
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23: 131-171.

- Deryckere D, Eeckhaut T, Van Huyenbroeck J, Van Bockstaele E. 2012. Low melting point agarose beads as a standard method for plantlet regeneration from protoplasts within the *Cichorium* genus. *Plant Cell Rep*, 31: 2261-2269.
- Dhanya J, Leen NA, Deepthi DC, Moushmi M, Beena MR, Sheela MN, Makesh Kumar T. 2017. Comparative Potential of Somatic Embryogenesis and Friable Embryogenic Callus Production in Farmer Preferred Indian Cassava Cultivars. *Journal of Root Crops*, 43(1): 23-33.
- Díaz-Tatis PA, Herera-Corzo M, Ochoa Cabezas JC, Medina Cipaguata A, Príaz MA, Verdier V, Chavarriaga-Aguirre P, López Carrascal E. 2018. The overexpression of *RXam1*, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Planta*, 247(4): 1031-1042.
- Duquenne B, Eeckhaut T, Werbrouck S, Van Huylenbrouck J. 2007. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 91:165–173.
- Eeckhaut T, Lakshmanan PS, Deryckere D, Van Bockstaele E, Van Huylenebroeck J. 2013. Progress in plant protoplast research. *Planta*, 238(6): 991-1003.
- Fister AS, Landherr L, Perryman M, Zhang Y, Guiltinan MJ, Maximova SN. 2018. Glucocorticoid receptor-regulated TcLEC2 expression triggers somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* leaf tissue. *PLoS ONE*, 13(11): e0207666
- Fitriani H, Rahman N, Kurniawati S, Aryaningym PD, Hartati NS. 2019. Isolasi dan kultur protoplas mesofil daun dari beberapa genotip ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz). *Biopropal Industri*, 10(1): 1-13.
- Fiuk A, Rybczynski JJ. 2007. The effect of several factors on somatic embryogenesis and plant regeneration in protoplast culture of *Gentiana kurroo* (Royle). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 91: 263-271.
- Food and Agriculture Organizations of United Nations (FAO). 2010. Cassava Diseases in Africa a major threat to food security: Strategic programme framework 2010-2015. Roma, Italia.

- Food and Agriculture Organizations of United Nations (FAO). 2013. Save and Grow: Cassava. A guide of sustainable production intensification. ISBN 978-92-5-107642-2. Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organizations of United Nations (FAO). 2017. Food Outlook: Biannual report of global food markets. ISSN 1560-8182.
- Gamborg OL, Miller RA., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1): 151–158.
- Gomez MA, Lin D, Moll T, Chauhan RD, Hayden L, Renninger K, Beyen G, Taylor NJ, Carrington JC, Staskiewicz BJ, Bart RS. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava *eIF4E* isoforms *nCBP-1* and *nCBP-2* reduces cassava Brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnology Journal*, 17: 421-434.
- Ihemere UE, Narayanan NN, Sayre RT. 2012. Iron biofortification and homeostasis in transgenic cassava roots expression the algal iron assimilatory gene, *FEA1*. *Frontiers in Plant Science*, 3: 1-22.
- Jobling, S. Improving starch for food and industrial applications. 2004. *Current opinion in Plant Biology*, 7: 210-218.
- Jones AMP, Shukla MR, Biswas GCG, Saxena PK. 2014. Protoplast-to-plant regeneration of American elm (*Ulmus americana*). *Protoplasma*, 252(3): 925-931.
- Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tujela N. 2016. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-13.
- Kielkowska A, Adamus A. 2014. Embedding in filter-sterilized alginate enhances *Brassica oleraceae* L. protoplast culture. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica*, 56(2) 20-26.
- Larkin PJ. 1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta*, 128(3): 213-216.

- Lentz EM, Eisner S, McCallum EJ, Schlegel K, De Assis de Paiva Campos F, Gruissem W, Vanderschuren H. 2018. Genetic Transformation of Recalcitrant Cassava by Embryo Selection and Increased Hormone Levels. *Methods and Protocols*, 1 (42): 1-10.
- Lin CS, Hsu CT, Yang LH, Lee LY, Fu JY, Cheng QW, Wu FH, Hsiao HCW, Zhang Y, Zhang R, Chang WJ, Yu CT, Wang W, Liao LJ, Gelvin SB, Shih MC. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnology Journal*, 16: 1295-1310.
- Liu J, Zheng Q, Ma Q, Gadidasu KK, Zhang P. 2011. Cassava Genetic Transformation and its Application in Breeding. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(3): 552-569.
- Lopez-Arellano M, Dhir S, Colón Albino N, Santiado A, Morris T, Dhir SK. 2015. Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Protoplast Culture of *Stevia rebaudiana*. *British Biotechnology Journal*, 5(1): 1-12.
- Máckowska K, Jarosz A, Grzebelus E. 2014. Plant regeneration from leaf-derived protoplast within the *Daucus* genus: effect of different conditions in alginate embedding and phytosulfokine application. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 117(2): 241-252.
- Manshardt R. 2004. Crop Improvement by Conventional Breeding or Genetic Engineering: How Different Are They? College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), BIO-5: 1-3.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Ntui VO, Kong K, Khan RS, Igawa T, Janavi GJ, Rabindran R, Nakamura I, Mii M. 2014. Resistance to Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) in Genetically Engineered Cassava cv. KU50 through RNA Silencing. *PLoS ONE*, 10(4): 1-23.

- Nyaboga E, Njiru J, Nguu E, Gruissem W, Vanderschuren H, Tripathi L. 2013. Unlocking the potential of tropical root crop biotechnology in east Africa by establishing a genetic transformation platform for local farmer-preferred cassava cultivar. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-11.
- Ochoa JC, Chavarriaga P, López C. 2012. Embriogénesis somática y producción de callo embriogénico friable de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2): 20-27.
- Odipto J, Alicai T, Ingelbrecht I, Nusinow DA, Bart R, Taylor NJ. 2017. Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing of *Phytoene desaturase* in Cassava. *Front. Plant Sci.* 8:1780.
- Ojola PO, Nyaboga EN, Njiru PN, Orinda, G. 2018. Overexpression of rice thaumatin-like protein (*Ostlp*) gene in transgenic cassava results in enhanced tolerance to *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Manihotis*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16: 125-131.
- Park J, Choi S, Park S, Yoon J, Park AY, Choe S. 2019. DNA-free genome editing via ribonucleoprotein (RNP) delivery of CRISPR/Cas in lettuce. *Methods Mol Biol*, 1917: 337-354.
- Patil BL, Legg JP, Kanju E, Fauquet CM. 2015. Cassava Brown streak disease: a threat to food security in Africa. *Journal of General Virology*, 96: 956-968.
- Pizarro M, Sánchez T, Ceballos H, Morante N, Dufour D. 2016. Diversificación de los almidones de yuca y sus posibles usos en la industria alimentaria = Diversification of cassava starch and its possible uses in food industry. *Revista Politécnica* 37(2): 1-6.
- Rahmani MS, Pijut PM, Shabanian N. 2016. Protoplast isolation and genetically true-to-type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of *Albizia julibrissin*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 127: 475-488.

- Rossin CB, Rey MEC. 2011. Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. South Africa Journal of Botany, 77: 59-65.
- Schenk, RV, Hildebrandt AC. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Canadian Journal of Botany, 50: 199-204.
- Schöpke C, Taylor N, Carcamo R, Konan NDK, Marmey P, Henshaw, GG, Beachy RN, Fauquet C (1996) Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. Nat Biotechnol, 14: 731–735.
- Shanin EA, Shepard JF. 1980. Cassava mesophyll protoplast: isolation, proliferation and shoot formation. Plant Science Letters, 17: 459-465.
- Shi G, Yang L, He T. 2016. Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana straminea* Maxim. Open Life Sci, 11: 55–60
- Shiba T, Mii M 2005. Plant regeneration from mesophyll-and cell suspension-derived protoplasts of *Dianthus acicularis* and characterization of regenerated plants. In vitro Cell Dev Plant, 41:794–800.
- Soda N, Verma L, Giri J. CRISPR-Cas9 based plant genome editing: Significance, opportunities and recent advances. Plant Physiology and Biochemistry, 313: 2-11.
- Sofiari E, Raemakers CJJM, Bergervoet JEM, Jacobsen E, Visser RGF. 1998. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. Plant Cell Reports, 18: 159-165.
- Sushamakumari S, Asokan MP, Anthony P, Lowe KC, Power JB, Davey MR. 2000. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61: 81-85.
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Cigan AM. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Communications, 16(7): 13274.



- Taylor N, Gaitán-Solís E, Moll T, Trauterman B, Jones T, Pranjali A, Trembley C, Abernathy V, Corbin D, Fauquet CM. 2012. A High-throughput Platform for the Production and Analysis of Transgenic Cassava (*Manihot esculenta*) Plants. *Tropical Plant Biol*, 5: 127-139.
- Taylor NJ, Edwards M, Kiernan RJ, Davey CDM, Blakesley D, Henshaw GG. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14: 726-730.
- Telengech PK, Maling'a JN, Nyende AB, Gichuki ST, Wanjala BW. 2015. Gene expression of beta carotene genes in transgenic biofortified cassava. *3 Biotech*, 5: 465-472.
- The Law Library of Congress. 2014. Restrictions on Genetically Modified Organisms. Estados Unidos. Disponible en: <https://www.loc.gov/law/help/restrictions-on-gmos/index.php> (Último acceso: 11/11/18).
- Tomiczak K, Mikula A, Sliwinska E, Rybezyński JJ. 2015. Autotetraploid plant regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplast of diploid *Gentiana decumbens* L.f. *In Vitro Cell.Dev.Biol.*, 51: 350-359.
- Welsch R, Arango K, Bär C, Salazar B, Al-Babili S, Beltrán J, Chavarriaga P, Ceballos H, Tohme J, Beyer P. 2010. Provitamin A Accumulation in Cassava (*Manihot esculenta*) Roots Driven by a Single Nucleotide Polymorphism in a Phytoene Synthase Gene. *The Plant Cell*, 22: 3348-3356.
- Wen F, Xiao SX, Nie YM, Ma QX, Zhang P, Guo WW. 2012. Protoplast Culture Isolated from Friable Embryogenic Callus of Cassava and Plant Regeneration. *Scientia Agricultura Sinica*. 45(19): 4050-4056.
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, K, ST, Choe S, Kim JS. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 33(11): 1162-1164.

- Zainuddin IM, Schlegel K, Gruijssem W, Vanderschuren H. 2012. Robust transformation procedure for the production of transgenic farmer-preferred cassava landraces. *Plant Methods*, 8(24): 1-8.
- Zhang P, Puonti-Kaerlas J. 2000. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Reports*, 19: 1041-1048.
- Zhang Y, Malzahn AA, Sretenovic S, Qi Y. 2019. The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. *Nature Plants*, 5: 778-794.
- Zhao SS, Dufour D, Sánchez T, Ceballos H, Zhang P. 2011. Development of Waxy Cassava with different biological and physico-chemical characteristics of starches for industrial applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8): 1925-1935.

## 14. ANEXOS

*Anexo 1.* Medios de cultivo empleados. El medio TM2G tiene modificaciones del medio de Sofiari *et al.* (1998). Para las sales mayores y menores MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), sales mayores y menores SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968) se indica la concentración del stock utilizado. AC: autoclavado.

Componente	TM2G 1X NZ	TM2G 1X KNB	SH	ME001	ME006.3	ME007	MSN	ME007 Agar
Sales mayores y menores MS				4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L
Sales mayores y menores SH			3,18 g/L					
KI	0,38 mg/L	0,38 mg/L						
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L	6,2 mg/L						
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	16,9 mg/L	16,9 mg/L						
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L	8,6 mg/L						
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L	0,25 mg/L						
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L	0,025 mg/L		0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L	0,025 mg/L						
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	18,5 mg/L	18,5 mg/L						
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13,9 mg/L	13,9 mg/L						
KNO <sub>3</sub>	1500 mg/L	1500 mg/L						
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440 mg/L	440 mg/L						
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370 mg/L	370 mg/L						
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L	170 mg/L						
Vitaminas MS (1000X)			1 ml/L	1 ml/L			1 ml/L	
Vitaminas B5 (1000X)	1 ml/L	1 ml/L			1 ml/L	1 ml/L		1 ml/L
Ácido ascórbido	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
Pantotenato de calcio	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
Cloruro de colina	0,1 mg/L	0,1 mg/L						
Ácido fólico	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
Riboflavina	0,25 mg/L	0,25 mg/L						
Biotina	0,05 mg/L	0,05 mg/L						
Glicina	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
L-Cisteína	1 mg/L	1 mg/L						

Caseína hidrolizada	150 mg/L	150 mg/L			50 mg/L	50 mg/L		50 mg/L
Sulfato de adenina	40 mg/L	40 mg/L						
L-Glutamina	100 mg/L	100 mg/L						
Ácido málico	10 mg/L	10 mg/L						
Sorbitol	4,56 g/L	4,56 g/L						
Manitol	4,56 g/L	4,56 g/L						
Glucosa	59,4 g/L	59,4 g/L						
Sacarosa			60 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
NAA	0,5 mg/L	1 mg/L		0,02 mg/L			1 mg/L	
Ribósido de zeatina	1 mg/L							
BAP		1 mg/L		0,04 mg/L				
Kinetina		2 mg/L						
Picloram			12 mg/L		12 mg/L	12 mg/L		12 mg/L
GA <sub>3</sub>				0,05 mg/L				
MES	97,6 mg/L	97,6 mg/L						
Agarosa							6 g/L	
Gelrite						2 g/L		
Agar				4,5 g/L				8 g/L
pH (ajustado con KOH)	5,7	5,7	5,8	6,11 a 6,14	6,11 a 6,14	6,11 a 6,14	5,8	6,11 a 6,14
Esterilización	Filtrado 0,22 µm	Filtrado 0,22 µm	Filtrado 0,22 µm	AC	AC	AC	AC	AC

*Anexo 2.* Soluciones utilizadas en digestión de OES de yuca para aislamiento de protoplastos.

<b>Componente</b>	<b>Solución enzimática</b>	<b>WI</b>
Manitol	0,6 M	0,5 M
KCl	10 mM	20 mM
MES (pH 5,7)	20 mM	4 mM
NaCl		
Celulasa R10	1,5%	
Macerozima R10	0,75%	
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	
BSA	0,1%	

## **CAPÍTULO 2. Artículo científico resultado de investigación.**

Artículo escrito en el formato Revista Orinoquia.

**Desarrollo de un protocolo para la regeneración de plantas a partir de  
protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas de yuca  
(*Manihot esculenta* Crantz)**

**Development of a protocol for plants regeneration from protoplasts isolated from  
organized embryonegic structures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**

**Desenvolvimento de um protocolo para a regeneração de plantas a partir de  
protoplastos isolados de estruturas embriogénicas organizadas de mandioca  
(*Manihot esculenta* Crantz)**

Juan P. Arciniegas-Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de los  
Llanos, Villavicencio, Colombia

**RESUMEN**

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se caracteriza por una raíz con un alto contenido de almidón que tiene usos alimenticios e industriales. Debido a esto, es una especie de interés para mejoramiento genético mediante técnicas biotecnológicas como la edición de genomas. Estas técnicas son necesarias ya que la manipulación genética en yuca presenta barreras por ser una planta altamente heterocigota, lo que hace difícil la segregación de transgenes sin que se pierdan características de genotipos establecidos comercialmente en el proceso. Es por esto que es crucial el desarrollo de métodos de edición libres de ADN. Para este fin, se propuso desarrollar un protocolo de regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas. Los aislamientos tuvieron un rendimiento de  $6,47 \times 10^6$  células/gramo de pesos fresco y una viabilidad del 89,5%. Se probaron dos sistemas de cultivo, pero se optó por las gotas de agarosa por generar estructuras con una forma tridimensional definida. Se comparó el efecto del genotipo, densidad hormonal y densidad celular inicial y se evaluó el número de microcolonias producidos. Los genotipos no mostraron diferencias significativas, contrario a la combinación hormonal y la densidad celular inicial. La combinación de factores con mejores rendimientos fue  $2 \times 10^5$  células/ml en medio con 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de NAA y 1 mg/L BAP. Adicional a esto, en esta combinación de factores

se evidenció formación y crecimiento de microcallos del genotipo TMS 60444 de forma esporádica. Para mejorar la frecuencia de formación de microcallos y la subsecuente embriogénesis somática se sugiere hacer cultivos con protoplastos embebidos en agarosa con medio suplementado con 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de NAA y 1 mg/L BAP, utilizar una densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml o superior y agregar otros factores como células nodrizas o proteína LEC2.

**Palabras clave:** *Manihot esculenta*, protoplastos, estructuras embriogénicas organizadas, gotas de agarosa

## **ABSTRACT**

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is characterized by a root with a high starch content that has food and industrial uses. Because of this, it is a species of interest for genetic improvement through biotechnological techniques such as genome editing. These techniques are necessary since genetic manipulation in cassava presents barriers because it is a highly heterozygous plant, which makes segregation of transgenes difficult without losing characteristics of commercially established genotypes in the process. This is why the development of DNA-free editing methods is crucial. For this purpose, it was proposed to develop a plant regeneration protocol from protoplasts isolated from organized embryogenic structures. The isolation yields were  $6.47 \times 10^6$  cells/gram of fresh weights and the viability of 89.5%. Two culture systems were tested, but agarose droplets were chosen because structures formed inside of them had a defined three-dimensional shape. The genotype effect, hormonal density and initial cell density were compared and the number of microcolonies produced was evaluated. The genotypes showed no significant differences, contrary to the hormonal combination and initial cell density. The combination of factors with better yields was  $2 \times 10^5$  cells/ml in medium with 2 mg/L of kinetin, 1 mg/L of NAA and 1 mg/L BAP. In addition to this, in this combination of factors, formation and growth of microcalli of the TMS 60444 genotype was evidenced sporadically. To improve the frequency of microcalli formation and somatic embryogenesis, it is suggested to make cultures with protoplasts embedded in agarose with medium supplemented with 2 mg/L of kinetin, 1 mg/L of NAA and 1 mg/L BAP, use

an initial cell density of  $2 \times 10^5$  cells/ml or higher and add other factors such as feeder cells or LEC2 protein.

**Key words:** *Manihot esculenta*, protoplasts, organized embryogenic structures, agarose droplets.

## RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é caracterizada por uma raiz com alto teor de amido, que tem uso alimentar e industrial. Por causa disso, é um tipo de interesse pelo melhoramento genético por meio de técnicas biotecnológicas, como a edição do genoma. Essas técnicas são necessárias, uma vez que a manipulação genética na mandioca apresenta barreiras por ser uma planta altamente heterozigótica, o que dificulta a segregação de transgenes sem perder as características dos genótipos comercialmente estabelecidos no processo. É por isso que o desenvolvimento de métodos de edição livres de DNA é crucial. Para tanto, foi proposto o desenvolvimento de um protocolo de regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de estruturas embriogênicas organizadas. Os isolados apresentaram um rendimento de  $6,47 \times 10^6$  células/grama de peso fresco e uma viabilidade de 89,5%. Dois sistemas de cultura foram testados, mas gotas de agarose foram escolhidas para gerar estruturas com uma forma tridimensional definida. O efeito genotípico, densidade hormonal e densidade celular inicial foram comparados e o número de microcolônias produzidas foi avaliado. Os genótipos não apresentaram diferenças significativas, ao contrário da combinação hormonal e densidade celular inicial. A combinação de fatores com melhores rendimentos foi de  $2 \times 10^5$  células/ml em meio com 2 mg/L de cinetina, 1 mg/L de NAA e 1 mg/L de BAP. Além disso, nessa combinação de fatores, a formação e o crescimento de micro-colos do genótipo TMS 60444 foram evidenciados esporadicamente. Para melhorar a frequência de formação de microcadeias e subsequente embriogênese somática, sugere-se fazer culturas com protoplastos embutidos em agarose com meio suplementado com 2 mg/L de cinetina, 1 mg/L de NAA e 1 mg/L de BAP, usar uma densidade celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml ou superior e adicionar outros fatores, como células de enfermeira ou proteína LEC2.



**Palavras chave:** *Manihot esculenta*, *protoplastos*, *estruturas embriogênicas organizadas*, *gotas de agarose*.

## INTRODUCCIÓN

La yuca es un cultivo cuya característica principal es poseer una raíz con un alto contenido de almidón útil como fuente de alimentos y en la industria de textiles, papel, materia prima de biocombustibles, entre otros (FAO, 2013). Su producción mundial en los últimos tres años ha alcanzado valores entre los 277 y 278,8 millones de toneladas de raíz, con África, Asia y América Latina como los mayores productores en su orden respectivo (FAO, 2017). Dada su importancia, es crucial el desarrollo de nuevas tecnologías que aceleren el desarrollo de nuevas variedades con características deseables que le permitan a la yuca enfrentar los desafíos de una población creciente, que demanda más consumo de almidón, en un medio ambiente en constante cambio.

En yuca se han realizado trabajos en mejoramiento genético con aplicación de biotecnología relativos a biofortificación (Welsch *et al.*, 2010; Ihemere *et al.*, 2012; Telengech *et al.*, 2015) modificaciones en la composición del almidón con fines industriales (Zhao *et al.*, 2011), resistencia a patógenos (Ntui *et al.*, 2015; Ojola *et al.*, 2018; Díaz-Tatis *et al.*, 2018), entre otros. Los trabajos anteriores fueron realizados mediante la transformación genética a través de *Agrobacterium tumefaciens*, una metodología con protocolo estandarizado para yuca (Bull *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012). Sin embargo, a la fecha, ninguna de las iniciativas para el mejoramiento de yuca que ha utilizado *transgénesis* ha producido una variedad que llegue al mercado, posiblemente debido a los altos costos inherentes a la regulación para la liberación de transgénicos en el mundo. Ya que la yuca es una especie altamente heterocigota, el eliminar transgenes a través de segregación sexual es desventajoso porque altera los genotipos obtenidos mediante edición debido a que la recombinación genética en esta especie altamente heterocigota (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 2016). Por tal motivo, una alternativa prometedora es la implementación del sistema CRISPR/Cas9 mediante un método libre de *transgénesis* basado en protoplastos y ribonucleoproteínas, moléculas híbridas de ácido ribonucleico y proteína (RNPs) (Woo *et al.*, 2015)

La generación de protoplastos en yuca se remonta al trabajo de Shahin y Shepard (1980), quienes adaptaron un protocolo diseñado para papa que se basaba en el uso de células de mesófilo del cultivar Mexico N° 35 y obtuvieron callos que generaron brotes de forma esporádica. Anthony *et al.* (1995) aislaron protoplastos de hojas de la variedad M Thai 8, pero obtuvieron solo callos friables con 1 o 2 raíces, sin lograr brotes. No fue sino hasta el estudio de Sofiari *et al.* (1998) en el que aislaron protoplastos de callo embriogénico friable (CEF) de la variedad TMS 60444, de los cuales se regeneraron 45 plantas a partir de 15 líneas independientes, de las que sobrevivieron 43 en invernadero. Wen *et al.* (2012) nuevamente usaron CEF de TMS 60444 y obtuvieron 186 plantas regeneradas. Recientemente, Fitriani *et al.* (2019) incursionaron en la regeneración de protoplastos de yuca obtenidos de mesófilo en tres variedades (Metenga 2, Ubi Kining y Gajah), pero solo llegaron a la formación de microcallos y callos.

A pesar de que los reportes de regeneración de protoplastos de yuca usaron como base el CEF, este tejido es difícil de obtener en diferentes genotipos ya que la regeneración *in vitro* de la yuca es altamente genotipo-dependiente (Liu *et al.*, 2011). Se han hecho varios esfuerzos por adaptar los protocolos para producción de CEF en TMS 60444 a otras variedades por el interés que ha existido de modificarlas genéticamente, pero el éxito ha sido moderado (Ochoa *et al.*, 2012; Zainuddin *et al.*, 2012; Nyaboga *et al.*, 2013; Apio *et al.*, 2015; Dhanya *et al.*, 2017; Lentz *et al.*, 2018). Sin embargo, una buena cantidad de variedades logran producir con cierta eficiencia las OES, requeridas para producir CEF, lo que abre la posibilidad de utilizarlas para aislar protoplastos y regenerar plantas de una cantidad mayor de genotipos, inclusive con importancia económica, posiblemente facilitando la implementación de la edición genética, sin utilizar la transgénesis como intermediaria. Por lo tanto, es necesario definir las condiciones *in vitro* que sean apropiadas para la regeneración de plantas de yuca a partir de protoplastos obtenidos de OES.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Propagación de plantas**

145 Se propagaron ápices y nudos de plantas *in vitro* de los genotipos TMS 60444 (como  
146 genotipo modelo) y KU50 en medio ME001. Se dejaron crecer por 30 días a 28°C y  
147 fotoperiodo 16/8.

#### 148 **Inducción de estructuras embriogénicas organizadas (OES)**

149 Se cortó el ápice y las hojas de las plantas, el ápice fue propagado nuevamente en medio  
150 ME001. Estas plantas permanecieron 3 días para que sus yemas axilares crecieran en  
151 este lapso. Después, las yemas axilares fueron cortadas y puestas en medio líquido  
152 ME006.3 en oscuridad por 22 días para la inducción de embriogénesis somática.  
153 Transcurrido este tiempo, se transfirieron a medio ME007, donde permanecieron en  
154 oscuridad durante 21 días para la formación estructuras embriogénicas organizadas  
155 (OES).

#### 156 **Producción y cultivo de protoplastos**

157 ***Aislamiento y friabilización de estructuras embriogénicas organizadas (OES):*** Se  
158 tomó una cantidad equivalente a 18 clústeres de callos y se seleccionó solo el tejido  
159 embriogénico inmaduro para ser macerado en cada aislamiento.

160 ***Digestión enzimática de tejidos embriogénicos:*** Se adicionaron 2 ml de medio TM2G  
161 modificado de Sofiari *et al.* (1998) (Tabla 1) y 2 ml de solución enzimática (Tabla 2) y Se  
162 digirió el tejido toda la noche a 28°C 30 rpm en oscuridad.

163 ***Aislamiento de protoplastos:*** El procedimiento para aislamiento de protoplastos y  
164 regeneración de plantas se basó en el método de Sofiari *et al.* (1998) con modificaciones.  
165 Al día siguiente del inicio de la digestión enzimática, se filtró la suspensión de digestión  
166 a través de tres capas de papel Miracloth. Después, se realizaron dos lavados con  
167 solución de lavado WI (Tabla 1) y centrifugación a 1000 rpm por 5 min. Se resuspendió  
168 el pellet en 1 ml medio TM2G para continuar con el cultivo o en solución WI para  
169 transfección. Finalmente, se cuantificó la densidad de protoplastos en una cámara  
170 Neubauer en microscopio óptico.

171 ***Viabilidad:*** Se agregaron 20 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) 0,5% (p/v) a 500 µl  
172 de una solución con protoplastos, luego se incubó por 10 min (Larkin, 1976). La  
173 observación se realizó en un microscopio de fluorescencia y el porcentaje de células

174 viables se expresó como la porción de células teñidas respecto a las células totales en  
175 el campo óptico.

176 **Sistema de cultivo:** La suspensión de protoplastos se probó en dos sistemas de cultivo,  
177 uno líquido y otro con gotas de agarosa. El medio líquido consistió en 6 ml de medio  
178 TM2G suplementado con NAA 0,5 mg/L y ribósido de zeatina 1 mg/L, con una densidad  
179 aproximada de protoplastos de  $5 \times 10^5$  células/ml servidos en una caja Petri pequeña (60  
180 x 15 mm).

181 En el sistema de cultivo de gotas de agarosa se hicieron experimentos preliminares con  
182 cuatro versiones diferentes del medio TM2G, que se diferenciaron por su combinación  
183 hormonal:

184 Combinación PZ: picloram 12 mg/L, ribósido de zeatina 1 mg/L.

185 Combinación DNB: 2,4-D 0,5 mg/L, NAA 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L.

186 Combinación KNB: kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L.

187 Combinación NZ: NAA 0,5 mg/L, ribósido de zeatina 1 mg/L.

188 De estas, se continuaron experimentos con KNB y NZ.

189 Las gotas de agarosa se hicieron al mezclar partes iguales de medio líquido TM2G 2X  
190 con solución de agarosa de bajo punto de gelificación (Sigma) al 1,2%. Luego, la solución  
191 con protoplastos fue agregada a 34°C, con la que se sirvieron 10 gotas de 100 µl c/u con  
192 una densidad de protoplastos aproximada de  $1 \times 10^5$  o  $2 \times 10^5$  células/ml en cajas Petri  
193 profundas (100 x 25 mm), y se agregaron 10 ml de medio líquido a cada caja para  
194 suministrar sustancias necesarias para el desarrollo de los protoplastos y prevenir la  
195 deshidratación. La agarosa que no fue servida en gotas fue conservada en tubos Falcon  
196 de 50 ml a un volumen aproximado de 5 ml. Todas las versiones del medio TM2G fueron  
197 suplementadas con cefotaxime a una concentración final de 150 µg/ml.

198 **Desarrollo de microcolonias:** La concentración inicial de glucosa en el medio TM2G  
199 fue de 0,33 mol/L, pero esta fue paulatinamente reducida con los refrescos de medio.  
200 Para las cajas con gotas de agarosa, cada 10 días se refrescaba el cultivo de  
201 protoplastos añadiendo medio TM2G con 0,33 mol/L de las primeras dos veces, luego

202 con 0,30 mol/L de glucosa por dos veces más y 0,25 mol/L de glucosa las dos últimas  
203 veces.

204 Para los cultivos en medio líquido, se realizó la misma reducción gradual de la  
205 concentración de glucosa. Al terminar este proceso, se reemplazó el medio TM2G con  
206 medio SH líquido y el cultivo permaneció 4 semanas a 28°C en oscuridad.

207 **Maduración de microcallos:** Los microcallos formados en gotas de agarosa fueron  
208 transferidos a medio ME007 Agar, mientras que aquellos obtenidos en medio líquido se  
209 transfirieron a medio MSN.

## 210 **Análisis estadístico**

211 El número promedio de microcolonias por gota de agarosa de cada tratamiento  
212 (combinación hormonal/genotipo/densidad celular inicial) fue registrado. La medición se  
213 hizo con fotos tomadas a la misma altura dado que las gotas tienen una estructura  
214 tridimensional, y la cuantificación se hizo con el plugin cell counter de ImageJ. Se realizó  
215 un test de diferencia mínima significativa (LSD) con un  $P < 0,05$  para determinar el efecto  
216 de cada variable en el número de microcolonias con el software SAS 9.4.

## 217 **RESULTADOS**

### 218 **Aislamiento de protoplastos**

219 Los rendimientos de los aislamientos de protoplastos por el medio descrito fueron de  
220  $6,47 \times 10^6$  células/gramo de pesos fresco, con una viabilidad del 89,5% (Figura 1).

### 221 **Cultivos en medio líquido**

222 El sistema de cultivo en líquido de protoplastos de yuca provenientes de tejido  
223 embriogénico fue implementado por Sofiari *et al.* (1998), quienes partieron de CEF para  
224 este proceso. Este método se adaptó para protoplastos provenientes de OES. Sin  
225 embargo, esta estrategia presentó las siguientes barreras:

226 -En el primer mes de cultivo los protoplastos se aglomeraron y precipitaron, por lo que  
227 gran parte del material formó una capa en el fondo del recipiente (Figura 2A), por lo tanto,  
228 esta porción del material no se convirtió en microcallos.

-En los meses subsiguientes, se formaron numerosos microcallos en los cultivos en líquido. Estas estructuras eran de coloración de blanca a ligeramente amarilla y de consistencia blanda, no adoptaron una forma tridimensional definida (Figura 2B), de modo que no resistieron el cambio de medio líquido a sólido. Debido a esto, se optó por no continuar con este sistema de cultivo.

### **Cultivos en gotas de agarosa**

Se cuantificó el número de microcolonias formadas por los protoplastos en las gotas de agarosa. El tratamiento con mayor número promedio de microcolonias por gota de agarosa fue KBN/60444/2 x 10<sup>5</sup> células/ml (Tabla 3). Además, en este tratamiento se observaron estructuras de tipo microcallo en la periferia de las gotas (Figura 3D). Por el contrario, el tratamiento con menor número de microcolonias fue KBN/60444/1 x 10<sup>5</sup> células/ml (Tabla 3, Figura 3C).

Se determinó que el genotipo no tuvo un efecto significativo sobre el número de microcolonias, mientras que la combinación hormonal y la densidad celular inicial sí (Tabla 4). Una densidad de 2 x 10<sup>5</sup> células/ml y la combinación hormonal KNB resultaron en el mayor número promedio de microcolonias por gota de agarosa (Tabla 5).

### **Desarrollo de microcallos**

A pesar de que en los experimentos previamente descritos con gotas de agarosa no se formaron microcallos, en los ensayos preliminares con gotas de agarosa en diferentes combinaciones hormonales fue posible obtenerlos de protoplastos de TMS 60444 de forma esporádica con KNB. Los microcallos aparecieron en las gotas de agarosa y en los tubos Falcon con agarosa (Figura 4 A y B). Estas estructuras se caracterizaron por su consistencia dura y color amarillo. Fueron transferidos a medio ME007 Agar para su desarrollo subsecuente. Hasta la fecha, se obtuvieron callos como el de la Figura 4C, que siguen en el proceso de regeneración.

### **DISCUSIÓN**

La densidad celular inicial para los protoplastos de yuca aislados de OES con mejor rendimiento fue de 2 x 10<sup>5</sup> células/ml. En protoplastos de CEF de yuca cultivados en líquidos se probaron densidades de 2, 3, 5 y 10 x 10<sup>5</sup> células/ml, de las cuales 5 x 10<sup>5</sup>

células/ml dio los mejores rendimientos (Sofiari *et al.*, 1998). Wen *et al.* (2012) compararon las densidades de 2 y 5 x 10<sup>5</sup> células/ml en cultivos en líquido de protoplastos obtenidos de CEF y determinaron que 5 x10<sup>5</sup> células/ml favoreció la formación de embriones somáticos. Sin embargo, la densidad inicial optima suele variar de una especie a otra, hay reportes de regeneración de protoplastos embebidos en matriz sólida a densidades menores 5 x10<sup>5</sup> células/ml. Deryckere *et al.* (2012) probaron densidades desde 1 hasta 20 x 10<sup>4</sup> células/ml, con las que observaron un aumento progresivo de microcallos hasta 5 x 10<sup>4</sup> células/ml, dado que valores superiores a esta concentración disminuyeron significativamente la eficiencia. Por otro lado, hay reportes de regeneración con densidades iniciales óptimas de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml (Duquenne *et al.*, 2007; Bertini *et al.*, 2019; Tomiczak *et al.*, 2015), 2 x 10<sup>5</sup> células/ml (Conde y Santos, 2006; Fiuk y Rybczynski, 2007; Jones *et al.*, 2014), 3,5 x 10<sup>5</sup> células/ml (Shi *et al.*, 2016; Rahmani *et al.*, 2016) y 4 x 10<sup>5</sup> células/ml (Kielkowska y Adamus, 2018). Las células estimulan la división mitótica de células adyacentes al liberar factores de crecimiento al medio, de modo que una densidad celular por debajo de la óptima ocasiona una incapacidad de los protoplastos en mantener división celular (Davey *et al.*, 2005). Esto se observó con la densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml, ya que el número promedio de microcolonias por gotas fue menor. A pesar de que con 2 x10<sup>5</sup> células/ml se obtuvieron más microcolonias, los reportes de cultivo de protoplastos de yuca manejan densidades mayores, de modo que probar con aumentar el número inicial de células podría promover la división celular y subsecuente formación de microcallos.

Los factores de crecimiento vegetal (FCVs) usados en los medios de cultivo de protoplastos son un componente variable. La combinación hormonal con mayor número de microcolonias en las gotas de agarosa y aparición esporádica de microcallos formados a partir de protoplastos obtenidos de OES de yuca fue 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de NAA. En yuca, el uso de 0,5 mg/L de NAA y 1 mg/L de ribósido de zeatina en protoplastos de CEF ha sido efectivo para su regeneración (Sofiari *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2012), mientras que en protoplastos de hojas de yuca con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de NAA se indujo formación de microcallos (Fitriani *et al.*, 2019). El mejor rendimiento del tratamiento KNB puede deberse a la presencia de otras citoquininas

288 como BAP, que ha resultado efectivo en otras especies (Jones *et al.*, 2014; Rahmani *et*  
289 *al.*, 2016, Shi *et al.*, 2016, Bertini *et al.*, 2019, Park *et al.*, 2019).

290 El efecto benéfico de embeber los protoplastos en gotas de agarosa ha sido reportado  
291 previamente (Jones *et al.*, 2014; Tomiczak *et al.*, 2015; Bertini *et al.*, 2019). Duquenne *et*  
292 *al.* (2007) reportaron ventajas al cultivar protoplastos de *Spathiphyllum wallisii* y *Anthurium*  
293 *scherzerianum* en gotas de agarosa. Los protoplastos de estas especies se precipitaron  
294 al fondo de la caja Petri al estar en medio líquido, como en los experimentos preliminares  
295 del presente trabajo. Afirmaron que los protoplastos al encontrarse precipitados tenían  
296 menor accesibilidad a gases, además de que las células sanas estarían expuestas a  
297 mayores concentraciones de toxinas provenientes de células muertas vecinas. En un  
298 estudio con protoplastos de *Cichorium* (Deryckere *et al.*, 2012) se logró regeneración en  
299 la mayoría de genotipos y géneros probados al implementar el sistema de gotas de  
300 agarosa, lo cual no pudieron obtener con medio líquido solamente. Las ventajas  
301 observadas al usar gotas de agarosa fueron: distribución uniforme de las células en la  
302 agarosa, lo que evita aglomeración común en medio líquido; intercambio de nutrientes y  
303 gases con la fase líquida que los rodea con bajas concentraciones de agarosa, por el  
304 orden de 0,6%. López-Arellano *et al.* (2015) determinaron que una de las ventajas de las  
305 gotas de agarosa sobre el cultivo líquido en la regeneración de protoplastos de *Stevia*  
306 *rebaudiana* es que esta fase sólida estimula la división de estas células en las primeras  
307 etapas del cultivo.

308 Los reportes de regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de hojas  
309 incluyen varias especies tales como *Lactuca sativa* (Park *et al.*, 2019), *Solanum*  
310 *tuberosum* (Andersson *et al.*, 2018), *Vitis vinífera* (Bertini *et al.*, 2019), *Brassica oleraceae*  
311 (Kielkowska *et al.*, 2018), *Gentiana decumbens* (Tomiczak *et al.*, 2015), *Stevia*  
312 *rebaudiana* (López-Arellano *et al.*, 2015), entre otras. Las hojas son explantes que suelen  
313 estar disponibles dado que solo requiere de un apropiado protocolo para mantener  
314 plantas *in vitro* de una determinada especie y permite la obtención de protoplastos  
315 inclusive de varios genotipos. En el caso de *M. esculenta*, investigadores han aislado  
316 protoplastos de hojas de los genotipos Gajah, Ubi Kuning y Metenga 2 para regeneración  
317 de plantas y llegaron a la formación de microcallos (Fitriani *et al.*, 2019). A pesar de que



las hojas permiten el aislamiento de protoplastos de varios genotipos, los sistemas de regeneración de plantas a partir de protoplastos suelen involucrar embriogénesis somática (Sofiari *et al.*, 1998, Tomiczak *et al.*, 2005; Máckowska *et al.*, 2013, López-Arellano), de modo que el tejido embriogénico puede resultar más adecuado ya los niveles de expresión de genes relacionados con embriogénesis son superiores a los de hojas (Brand *et al.*, 2019).

Para mejorar la eficiencia de los procesos de formación de callo embriogénico y embriogénesis somática en los sistemas de regeneración de plantas a partir de protoplastos de yuca se puede incursionar en la implementación de células nodrizas y en la introducción de la proteína LEC2 en protoplastos. Las células nodrizas consisten en capas de células embriogénicas que se incorporan en el cultivo de protoplastos y liberan moléculas que estimulan procesos de división celular, lo que puede mejorar la formación de callo embriogénico en estos cultivos, así como ha sucedido en otras especies (Sushamakumari *et al.* 2000; Assani *et al.*, 2006; Chabane *et al.*, 2007). En cuanto a la proteína LEC2, estudios previos demostraron que su sobreexpresión promueve embriogénesis somática en yuca (Brand *et al.*, 2019) y *Theobroma cacao* (Fister *et al.*, 2018), de modo que incorporarla en los protoplastos podría mejorar el proceso de regeneración.

## CONCLUSIONES

Se cultivaron protoplastos aislados de estructuras embriogénicas de dos genotipos de yuca en dos sistemas diferentes, uno líquido y otro de gotas de agarosa. El cultivo en líquido presentó desventajas como precipitación del material y formación de tejido blando y sin estructura tridimensional clara, de modo que se optó por las gotas de agarosa. Posteriormente, se evaluó el efecto del genotipo, combinación hormonal y densidad celular inicial en el desarrollo de los protoplastos en gotas de agarosa. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de microcolonias formadas por protoplastos de TMS60444 y KU50, lo que es un indicador de que el método de regeneración puede ser aplicado a más de un genotipo sin aplicarle variaciones marcadas. En cuanto a la densidad celular inicial y la combinación hormonal, el tratamiento con mejor rendimiento fue  $2 \times 10^5$  células/ml y 2 mg/L de kinetina, 1 mg/L de NAA y 1 mg/L de BAP. Dado que

solo se logró obtener microcallos de forma esporádica, es necesario optimizar las condiciones del sistema de cultivo de protoplastos para aumentar la frecuencia de formación de callos, y subsecuentemente procesos de embriogénesis somática y regeneración. Para ello, se sugiere continuar con las gotas de agarosa dado el efecto positivo que tiene el embeber los protoplastos en una fase sólida, utilizar el medio TM2G con la combinación hormonal KNB, usar una densidad inicial celular igual o superior a  $2 \times 10^5$  células/ml, e incorporar nuevos factores como células nodrizas o la proteína LEC2.

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Paul Chavarriaga y a todo el equipo de trabajo de la Plataforma de mejoramiento avanzado del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por la guía y apoyo brindados en la realización del proyecto. A Alejandro Brand por todas sus enseñanzas sin las cuales la realización de este trabajo no hubiera sido posible. A los profesores del programa de Biología de la Universidad de los Llanos por contribuir a mi formación profesional a lo largo de estos años.

## REFERENCIAS

- Anthony P, Davey MR, Power JB, Lowe KC. 1995. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplast. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 42: 299-302.
- Apio HB, Alicai T, Baguma Y, Mukasa SB, Bua A, Taylor N. 2015. Production of friable embryogenic callus and regeneration of Ugandan farmer-preferred cassava genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 14(22): 1854-1864.
- Assani A, Chabane D, Foroughi-Wehr B, Wenzel G. 2006. An improved protocol for microcallus production and whole plant regeneration from recalcitrant banana protoplasts (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 257-264.
- Bertini E, Torielli GB, Pezzotti M, Zenoni S. 2019. Regeneration of plants from embryogenic callus-derived protoplasts of Garganega and Sangiovese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-8.
- Brand A, Quimbaya M, Tohme J, Chavarriaga-Aguirre P. 2019. Arabidopsis LEC1 and LEC2 Orthologous Genes Are Key Regulators of Somatic Embryogenesis in Cassava. *Front Plant Sci*, 10: 673.

378 Bull SE, Owiti JA, Niklaus M, Beeching JR, Gruissem W, Vanderschuren H. 2009.  
 379 *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of  
 380 transgenic cassava. *Nature Protocols*, 4(12): 1845-1854.

381 Chabane D, Assani A, Bouguedoura N, Haïcour R, Ducreux G. 2007. Induction of callus  
 382 formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *C. R. Biologies*,  
 383 330: 392-401.

384 Chavarriaga-Aguirre P, Brand A, Medina A, Prías M, Escobar R, Martinez J, Díaz P,  
 385 López C, Roca WM, Tohme J. 2016. The potential of using biotechnology to improve  
 386 cassava: a review. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 52: 461-478.

387 Conde P, Santos Conceicao. 2006. An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill. protoplast  
 388 isolation and culture in agarose droplets. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 359-366.

389 Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. 2005. Plant protoplasts: status and  
 390 biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23: 131-171.

391 Deryckere D, Eeckhaut T, Van Hylbroeck J, Van Bockstaele E. 2012. Low melting point  
 392 agarose beads as a standard method for plantlet regeneration from protoplasts within the  
 393 *Cichorium* genus. *Plant Cell Rep*, 31: 2261-2269.

394 Dhanya J, Leen NA, Deepthi DC, Moushmi M, Beena MR, Sheela MN, Makesh Kumar T.  
 395 2017. Comparative Potential of Somatic Embryogenesis and Friable Embryogenic Callus  
 396 Production in Farmer Preferred Indian Cassava Cultivars. *Journal of Root Crops*, 43(1):  
 397 23-33.

398 Díaz-Tatis PA, Herera-Corzo M, Ochoa Cabezas JC, Medina Cipaguata A, Prías MA,  
 399 Verdier V, Chavarriaga-Aguirre P, López Carrascal E. 2018. The overexpression of  
 400 *RXam1*, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas*  
 401 *axonopodis* pv. *manihotis*. *Planta*, 247(4): 1031-1042.

402 Duquenne B, Eeckhaut T, Werbrouck S, Van Huylenbrouck J. 2007. Effect of enzyme  
 403 concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and  
 404 *Anthurium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 91:165–173.

405 Fister AS, Landherr L, Perryman M, Zhang Y, Gultinan MJ, Maximova SN. 2018.  
 406 Glucocorticoid receptor-regulated TcLEC2 expression triggers somatic embryogenesis in  
 407 *Theobroma cacao* leaf tissue. *PLoS ONE*, 13(11): e0207666

408 Fitriani H, Rahman N, Kurniawati S, Aryaningym PD, Hartati NS. 2019. Isolasi dan kultur  
 409 protoplas mesofil daun dari beberapa genotip ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz).  
 410 Biopropal Industri, 10(1): 1-13.

411 Fiuk A, Rybczynski JJ. 2007. The effect of several factors on somatic embryogenesis  
 412 and plant regeneration in protoplast culture of *Gentiana kurroo* (Royle). Plant Cell Tiss  
 413 Organ Cult, 91: 263-271.

414 Food and Agriculture Organizations of United Nations (FAO). 2013. Save and Grow:  
 415 Cassava. A guide of sustainable production intensification. ISBN 978-92-5-107642-2.  
 416 Roma, Italia.

417 Food and Agriculture Organizations of United Nations (FAO). 2017. Food Outlook:  
 418 Biannual report of global food markets. ISSN 1560-8182.

419 Gemborg OL, Miller RA., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of  
 420 soybean root cells. Experimental Cell Research, 50(1): 151–158.

421 Ihemere UE, Narayanan NN, Sayre RT. 2012. Iron biofortification and homeostasis in  
 422 transgenic cassava roots expression the algal iron assimilatory gene, *FEA1*. Frontiers in  
 423 Plant Science, 3: 1-22.

424 Jones AMP, Shukla MR, Biswas GCG, Saxena PK. 2014. Protoplast-to-plant  
 425 regeneration of American elm (*Ulmus americana*). Protoplasma, 252(3): 925-931.

426 Kielkowska A, Adamus A. 2014. Embedding in filter-sterilized alginate enhances *Brassica*  
 427 *oleraceae* L. protoplast culture. Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica, 56(2) 20-  
 428 26.

429 Larkin PJ. 1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. Planta,  
 430 128(3): 213-216.

431 Lentz EM, Eisner S, McCallum EJ, Schlegel K, De Assis de Paiva Campos F, Grissem  
 432 W, Vanderschuren H. 2018. Genetic Transformation of Recalcitrant Cassava by Embryo  
 433 Selection and Increased Hormone Levels. Methods and Protocols, 1 (42): 1-10.

434 Liu J, Zheng Q, Ma Q, Gadidasu KK, Zhang P. 2011. Cassava Genetic Transformation  
 435 and its Application in Breeding. Journal of Integrative Plant Biology, 53(3): 552-569.

436 López-Arellano M, Dhir S, Colón Albino N, Santiado A, Morris T, Dhir SK. 2015. Somatic  
 437 Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Protoplast Culture of *Stevia rebaudiana*.  
 438 British Biotechnology Journal, 5(1): 1-12.

439 Mäckowska K, Jarosz A, Grzebelus E. 2014. Plant regeneration from leaf-derived  
 440 protoplast within the *Daucus* genus: effect of different conditions in alginate embedding  
 441 and phytosulfokine application. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 117(2): 241-252.  
 442 Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with  
 443 Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.  
 444 Ntui VO, Kong K, Khan RS, Igawa T, Janavi GJ, Rabindran R, Nakamura I, Mii M. 2014.  
 445 Resistance to Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) in Genetically Engineered  
 446 Cassava cv. KU50 through RNA Silencing. *PLoS ONE*, 10(4): 1-23.  
 447 Nyaboga E, Njiru J, Nguu E, Gruissem W, Vanderschuren H, Tripathi L. 2013. Unlocking  
 448 the potential of tropical root crop biotechnology in east Africa by establishing a genetic  
 449 transformation platform for local farmer-preferred cassava cultivar. *Frontiers in Plant*  
 450 *Science*, 4: 1-11.  
 451 Ochoa JC, Chavarriaga P, López C. 2012. Embriogénesis somática y producción de callo  
 452 embriogénico friable de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista*  
 453 *Colombiana de Biotecnología*, 14(2): 20-27.  
 454 Ojola PO, Nyaboga EN, Njiru PN, Orinda, G. 2018. Overexpression of rice thaumatin-like  
 455 protein (*Ostlp*) gene in transgenic cassava results in enhanced tolerance to  
 456 *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Manihotis*. *Journal of Genetic Engineering and*  
 457 *Biotechnology*, 16: 125-131.  
 458 Park J, Choi S, Park S, Yoon J, Park AY, Choe S. 2019. DNA-free genome editing via  
 459 ribonucleoprotein (RNP) delivery of CRISPR/Cas in lettuce. *Methods Mol Biol*, 1917: 337-  
 460 354.  
 461 Rahmani MS, Pijut PM, Shabanian N. 2016. Protoplast isolation and genetically true-to-  
 462 type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of *Albizia julibrissin*.  
 463 *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 127: 475-488.  
 464 Schenk, RV, Hildebrandt AC. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of  
 465 Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany*,  
 466 50: 199-204.  
 467 Shanin EA, Shepard JF. 1980. Cassava mesophyll protoplast: isolation, proliferation and  
 468 shoot formation. *Plant Science Letters*, 17: 459-465.

469 Shi G, Yang L, He T. 2016. Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana straminea*  
 470 Maxim. Open Life Sci, 11: 55–60

471 Sofiari E, Raemakers CJJM, Bergervoet JEM, Jacobsen E, Visser RGF. 1998. Plant  
 472 regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. Plant  
 473 Cell Reports, 18: 159-165.

474 Sushamakumari S, Asokan MP, Anthony P, Lowe KC, Power JB, Davey MR. 2000. Plant  
 475 regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. Plant Cell,  
 476 Tissue and Organ Culture, 61: 81-85.

477 Taylor N, Gaitán-Solís E, Moll T, Trauterman B, Jones T, Pranjal A, Trembley C,  
 478 Abernathy V, Corbin D, Fauquet CM. 2012. A High-throughput Platform for the  
 479 Production and Analysis of Transgenic Cassava (*Manihot esculenta*) Plants. Tropical  
 480 Plant Biol, 5: 127-139.

481 Telengech PK, Maling'a JN, Nyende AB, Gichuki ST, Wanjala BW. 2015. Gene  
 482 expression of beta carotene genes in transgenic biofortified cassava. 3 Biotech, 5: 465-  
 483 472.

484 Tomiczak K, Mikula A, Sliwinska E, Rybezynski JJ. 2015. Autotetraploid plant  
 485 regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplast of diploid  
 486 *Gentiana decumbens* L.f. In Vitro Cell.Dev.Biol., 51: 350-359.

487 Welsch R, Arango K, Bär C, Salazar B, Al-Babili S, Beltrán J, Chavarriaga P, Ceballos H,  
 488 Tohme J, Beyer P. 2010. Provitamin A Accumulation in Cassava (*Manihot esculenta*)  
 489 Roots Driven by a Single Nucleotide Polymorphism in a Phytoene Synthase Gene. The  
 490 Plant Cell, 22: 3348-3356.

491 Wen F, Xiao SX, Nie YM, Ma QX, Zhang P, Guo WW. 2012. Protoplast Culture Isolated  
 492 from Friable Embryogenic Callus of Cassava and Plant Regeneration. Scientia  
 493 Agricultura Sinica. 45(19): 4050-4056.

494 Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, K, ST, Choe S, Kim JS.  
 495 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9  
 496 ribonucleoproteins. Nat Biotechnol, 33(11): 1162-1164.

497 Zainuddin IM, Schlegel K, Grissem W, Vanderschuren H. 2012. Robust transformation  
 498 procedure for the production of transgenic farmer-preferred cassava landraces. Plant  
 499 Methods, 8(24): 1-8.

500 Zhao SS, Dufour D, Sánchez T, Ceballos H, Zhang P. 2011. Development of Waxy  
501 Cassava with different biological and physico-chemical characteristics of starches for  
502 industrial applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8): 1925-1935.

503 *Tabla 1.* Medios de cultivo empleados. El medio TM2G tiene modificaciones del medio  
504 de Sofiari *et al.* (1998). Para las sales mayores y menores MS (Murashige y Skoog,  
505 1962), vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), sales mayores y menores SH (Schenk  
506 y Hildebrandt, 1972) y vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968) se indica la concentración del  
507 stock utilizado. AC: autoclavado.

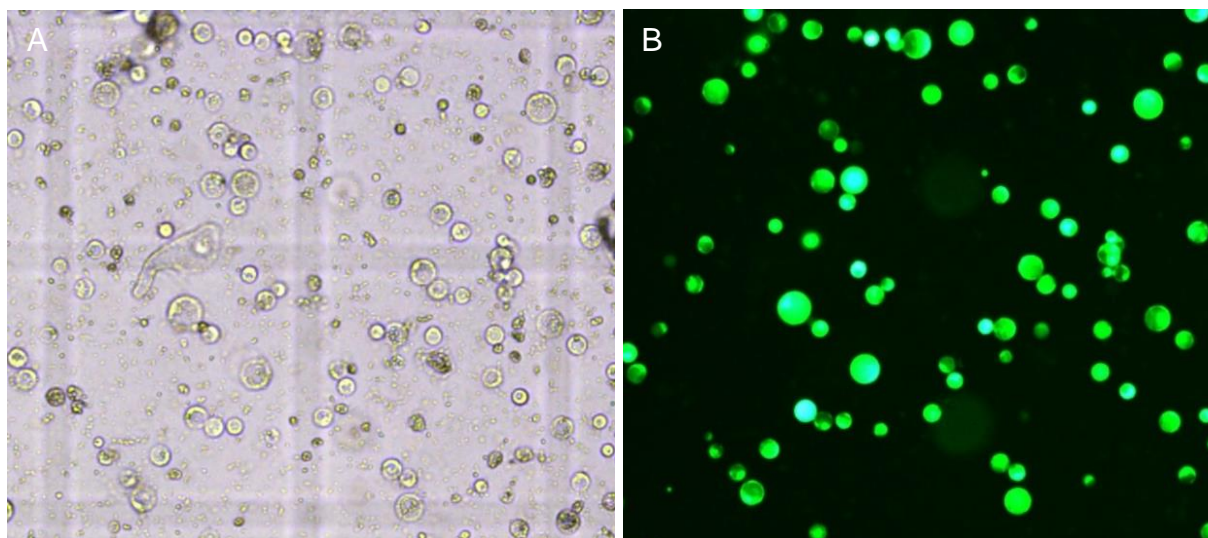
Componente	TM2G 1X NZ	TM2G 1X KNB	SH	ME001	ME006.3	ME007	MSN	ME007 Agar
Sales mayores y menores MS			3,18 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L
Sales mayores y menores SH								
KI	0,38 mg/L	0,38 mg/L						
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L	6,2 mg/L						
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	16,9 mg/L	16,9 mg/L						
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L	8,6 mg/L						
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L	0,25 mg/L						
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L	0,025 mg/L		0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L	0,025 mg/L						
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	18,5 mg/L	18,5 mg/L						
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13,9 mg/L	13,9 mg/L						
KNO <sub>3</sub>	1500 mg/L	1500 mg/L						
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440 mg/L	440 mg/L						
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370 mg/L	370 mg/L						
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L	170 mg/L	1 ml/L	1 ml/L			1 ml/L	
Vitaminas MS (1000X)								
Vitaminas B5 (1000X)	1 ml/L	1 ml/L			1 ml/L	1 ml/L		1 ml/L
Ácido ascórbido	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
Pantotenato de calcio	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
Cloruro de colina	0,1 mg/L	0,1 mg/L						
Ácido fólico	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
Riboflavina	0,25 mg/L	0,25 mg/L						
Biotina	0,05 mg/L	0,05 mg/L						
Glicina	0,5 mg/L	0,5 mg/L						
L-Cisteína	1 mg/L	1 mg/L						
Caseína hidrolizada	150 mg/L	150 mg/L			50 mg/L	50 mg/L		50 mg/L
Sulfato de adenina	40 mg/L	40 mg/L						



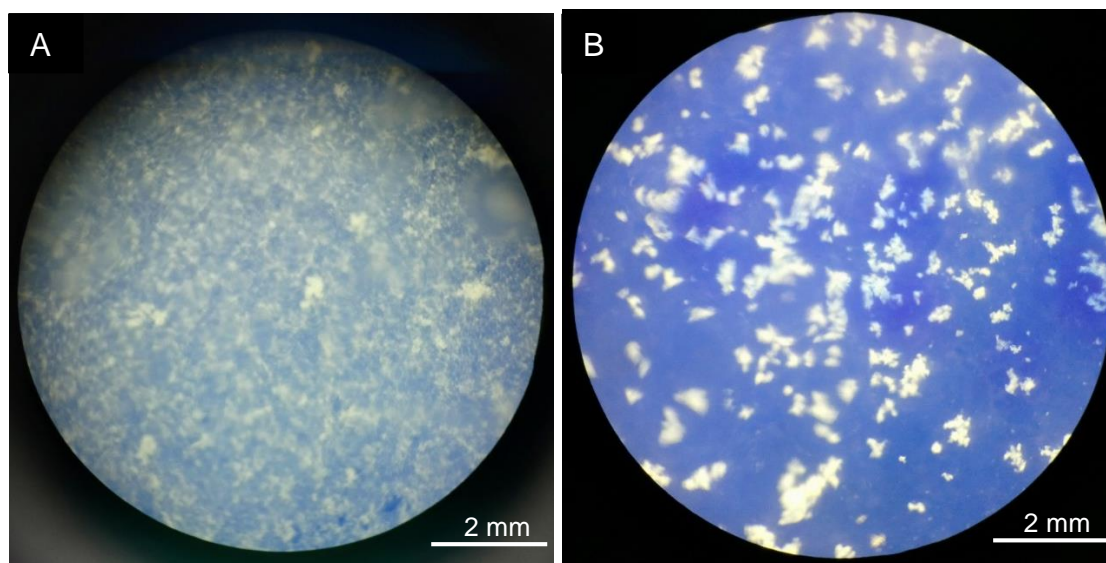
L-Glutamina	100 mg/L	100 mg/L						
Ácido málico	10 mg/L	10 mg/L						
Sorbitol	4,56 g/L	4,56 g/L						
Manitol	4,56 g/L	4,56 g/L						
Glucosa	59,4 g/L	59,4 g/L						
Sacarosa			60 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
NAA	0,5 mg/L	1 mg/L		0,02 mg/L			1 mg/L	
Ribósido de zeatina	1 mg/L							
BAP		1 mg/L		0,04 mg/L				
Kinetina		2 mg/L						
Picloram			12 mg/L		12 mg/L	12 mg/L		12 mg/L
GA <sub>3</sub>				0,05 mg/L				
MES	97,6 mg/L	97,6 mg/L						
Agarosa							6 g/L	
Gelrite						2 g/L		
Agar				4,5 g/L				8 g/L
pH (ajustado con KOH)	5,7	5,7	5,8	6,11 a 6,14	6,11 a 6,14	6,11 a 6,14	5,8	6,11 a 6,14
Esterilización	Filtrado 0,22 µm	Filtrado 0,22 µm	Filtrado 0,22 µm	AC	AC	AC	AC	AC

*Tabla 2. Soluciones utilizadas en digestión de OES de yuca para aislamiento de protoplastos.*

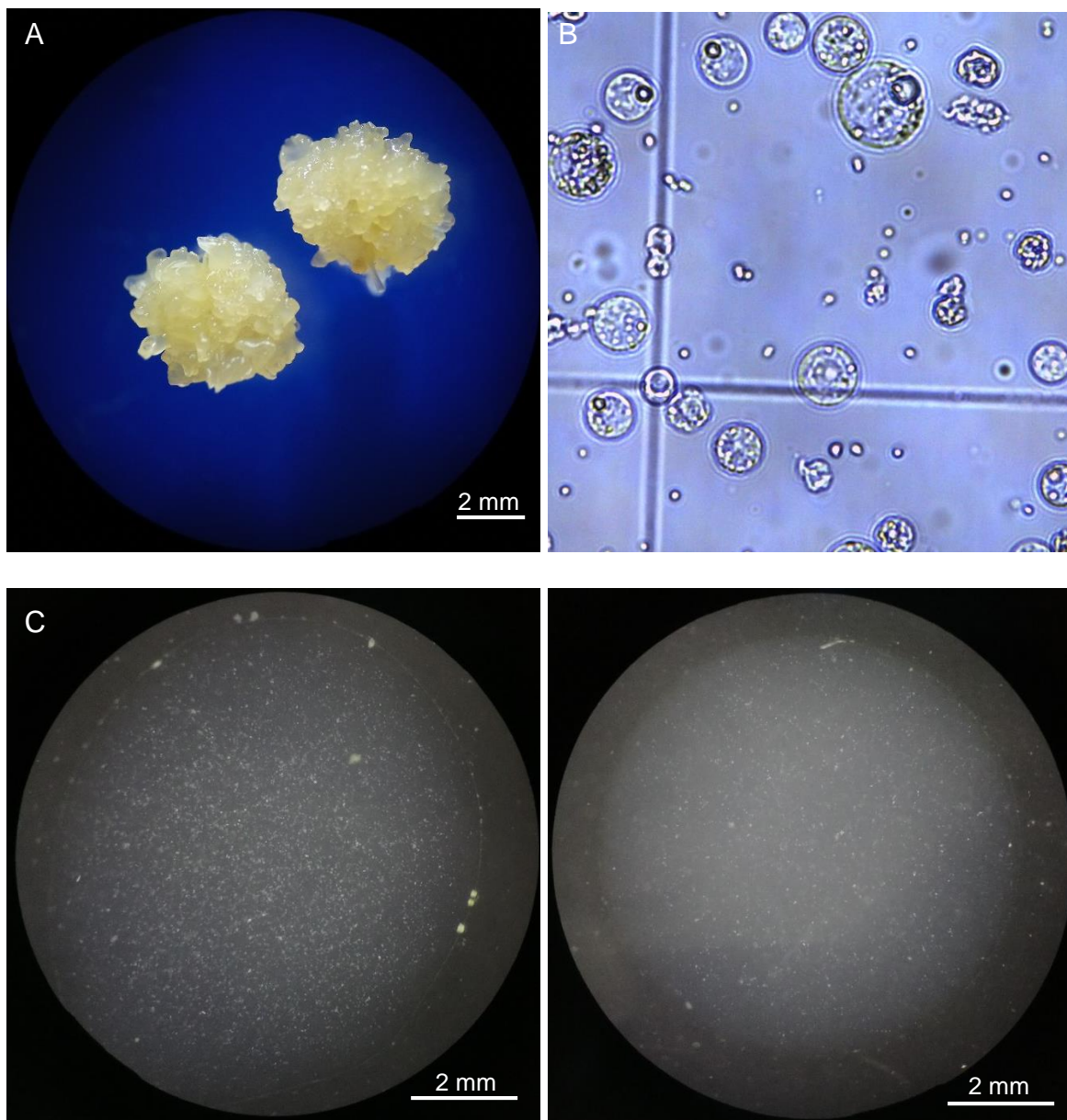
Componente	Solución enzimática	WI
Manitol	0,6 M	0,5 M
KCl	10 mM	20 mM
MES (pH 5,7)	20 mM	4 mM
NaCl		
Celulasa R10	1,5%	
Macerozima		
R10	0,75%	
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	
BSA	0,1%	



513  
 514 *Figura 5.* Prueba de viabilidad de protoplastos con FDA. (A) Protoplastos en luz blanca  
 515 con aumento de 10X. (B) Protoplastos en fluorescencia con aumento de 10X.



516  
 517 *Figura 6.* Protoplastos de TMS 60444 en cultivo líquido (A) Protoplastos a los 15 días de  
 518 cultivo. (B) Microcallos con 2 meses de crecimiento.



*Figura 7.* Regeneración de protoplastos de yuca. (A) Estructuras embriogénicas organizadas a partir de las cuales se aislaron protoplastos. (B) Protoplastos recién aislados observados a 40X. (C) Gota de agarosa con densidad inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml en medio con kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L. (D) Gota de agarosa con densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio con NAA 0,5 mg/L y ribósido de zeatina 1 mg/L.

*Tabla 3.* Número promedio de microcolonias formadas por protoplastos por gota de agarosa. Los tratamientos están definidos como la combinación de las variables

529 combinación hormonal (NZ o KNB), genotipo (60444 o KU50) y densidad celular inicial  
 530 (1 o 2 x 10<sup>5</sup> células/ml).

Tratamiento	Número promedio de microcolonias por gota de agarosa
NZ/60444/1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1302,87 ± 457,55
KNB/60444/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2955,50 ± 343,41
KNB/KU50/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2927,20 ± 308,65
NZ/60444/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2325,30 ± 307,98
KBN/60444/1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1262,10 ± 299,57
NZ/KU50/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2571,80 ± 240,61

531

532 *Tabla 4.* Efecto del genotipo, combinación hormonal y densidad celular inicial en la  
 533 producción de microcolonias. Diferentes letras en las medias corresponden a diferencias  
 534 significativas según el test de diferencia mínima significativa (LSD) con un P<0,05.

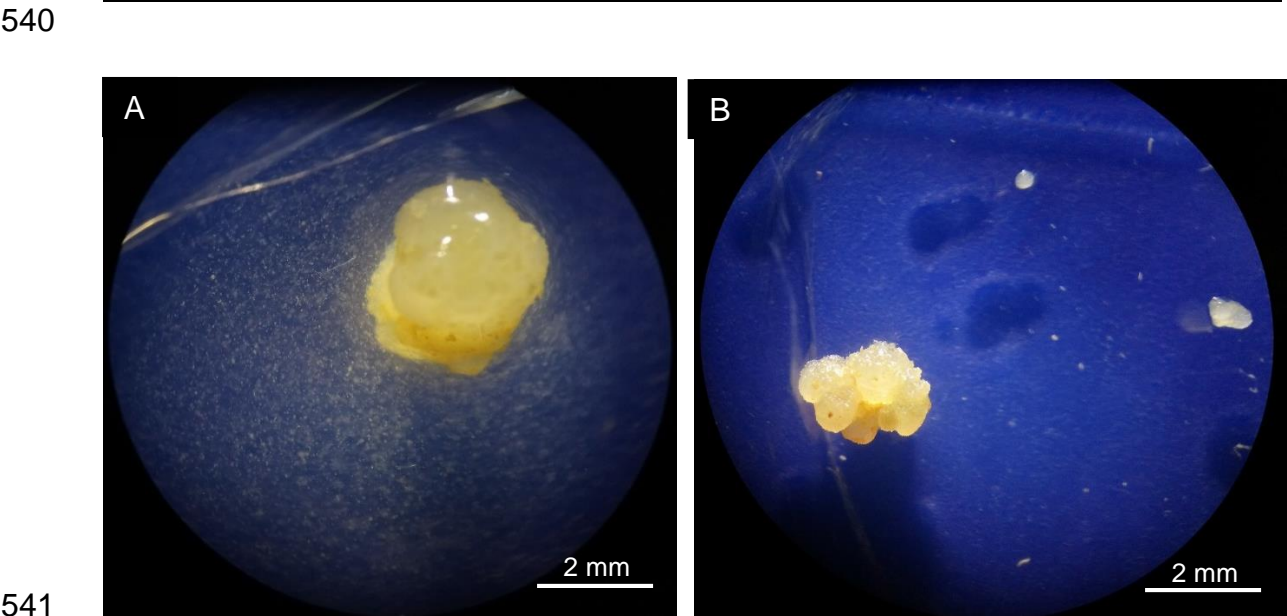
535

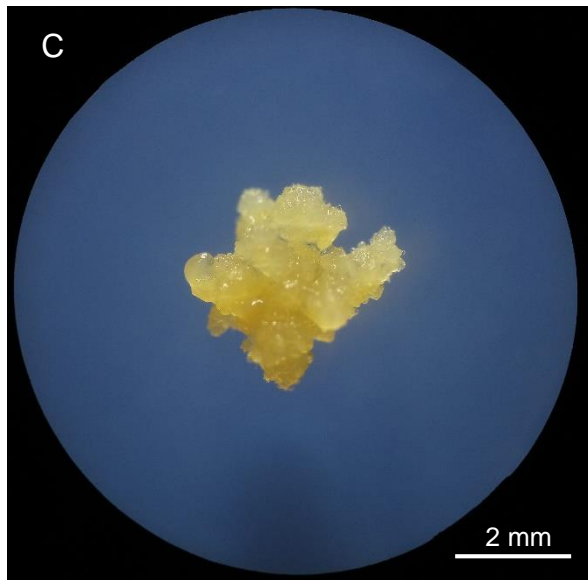
Factor	Número promedio de microcolonias por gota de agarosa
<b>Genotipo</b>	
60444	1833,85 ± 30,18 <sup>A</sup>
KU50	1919,26 ± 54,51 <sup>A</sup>
<b>Combinación hormonal</b>	
KNB	1949,13 ± 42,47 <sup>A</sup>
NZ	1805,74 ± 39,33 <sup>B</sup>
<b>Densidad celular inicial</b>	
1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1311,85 ± 37,56 <sup>A</sup>
2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2682,97 ± 43,90 <sup>B</sup>

536

537 *Tabla 5.* Efecto conjunto de la combinación hormonal y la densidad celular inicial en la  
538 producción de microcolonias. Diferentes letras en las medias corresponden a diferencias  
539 significativas según el test de diferencia mínima significativa (LSD) con un  $P < 0,05$ .

Factores	Número promedio de microcolonias por gota de agarosa
KNB/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2942,42 ± 68,07 <sup>A</sup>
NZ/2 x 10 <sup>5</sup> células/ml	2446,40 ± 56,64 <sup>B</sup>
KNB/1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1291,16 ± 47,42 <sup>C</sup>
NZ/1 x 10 <sup>5</sup> células/ml	1332,86 ± 49,45 <sup>C</sup>





542

543 *Figura 8.* Microcallos formados de protoplastos de TMS 60444 en agarosa en medio con  
544 kinetina 2 mg/L, NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L. (A) Microcallo formado en gota de agarosa  
545 con densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml a los 2 meses de cultivo. (B) Microcallo  
546 formado tubo Falcon con agarosa con densidad celular inicial  $2 \times 10^5$  células/ml a los 2  
547 meses de cultivo. (C) Microcallo en medio ME007 Agar a los 2 meses de cultivo.